



**X Съезд
Российского фотобиологического общества**

**Всероссийская конференция
“Современные проблемы фотобиологии”**

Краснодарский край пос. Шепси пансионат “Маяк”
10 – 17 сентября 2023 г.

Российское фотобиологическое общество
Институт фундаментальных проблем биологии
Российской академии наук – обособленное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения
науки «Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук»
Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

**X СЪЕЗД РОССИЙСКОГО
ФОТОБИОЛОГИЧЕСКОГО ОБЩЕСТВА**

**КОНФЕРЕНЦИЯ «СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ
ФОТОБИОЛОГИИ»**

*пос. Шепси Краснодарского края
10 – 17 сентября 2023 г.*

Материалы конференции

Пушино, 2023

УДК 577.355:577.344

ББК 28.07 + 28.57

С94

**С94 X Съезд Российского фотобиологического общества.
Конференция «Современные проблемы фотобиологии».
Материалы съезда. Пушино: ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2023. – 300 с.**

ISBN 978-5-6050635-0-6

С 10 по 17 сентября 2023 года в пос. Шепси Краснодарского края проходил X съезд Российского фотобиологического общества и конференция «Современные проблемы фотобиологии». В настоящем сборнике представлены тезисы 137 докладов участников по следующим направлениям:

- первичные процессы фотосинтеза;
- регуляция фотосинтеза;
- фоторецепция;
- фундаментальные основы фотодинамической и лазерной терапии;
- биофотоника молекул наночастиц, клеток и тканей;
- биолюминесценция и фотоника флуоресцентных белков;
- фотосинтезирующие организмы как преобразователи солнечной энергии в биотоплива и ценные продукты;
- экологическая фотобиология.

Публикуется в авторской редакции

УДК 577.355:577.344

ББК 28.07 + 28.57

ISBN 978-5-6050635-0-6

© Коллектив авторов
© Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
«Федеральный исследовательский
центр «Пушкинский научный центр
биологических исследований
Российской академии наук», 2023



ОГЛАВЛЕНИЕ

ОБРАЩЕНИЕ К УЧАСТНИКАМ	3
ОРГАНИЗАТОРЫ	5
ПРОГРАММА КОНФЕРЕНЦИИ	7
ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ	
Секция 1. Первичные процессы фотосинтеза	26
Секция 2. Регуляция фотосинтеза	51
Секция 3. Фоторецепция	108
Секция 4. Фундаментальные основы фотодинамической и лазерной терапии	125
Секция 5. Биофотоника молекул, наночастиц, клеток и тканей	161
Секция 6. Биоломинесценция и фотоника флуоресцентных белков	201
Секция 7. Фотосинтезирующие организмы как преобразователи солнечной энергии в биотоплива и ценные продукты	246
Секция 8. Экологическая фотобиология	264
АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ	289
СПОНСОРЫ И ПАРТНЕРЫ	296



ОБРАЩЕНИЕ К УЧАСТНИКАМ

Глубокоуважаемые коллеги! Дорогие друзья!

Мы рады приветствовать Вас на юбилейном X съезде Российского фотобиологического общества (РФО) и конференции «Современные проблемы фотобиологии», которые традиционно проводятся в пансионате Маяк, пос. Шепси Краснодарского края с 10 по 17 сентября 2023 г. В работе съезда и конференции примут участие более 100 человек. В рамках конференции будут представлены достижения ведущих ученых в области фотобиологии, исследований фотосинтеза и получения водорода как возобновляемого источника энергии. В ходе конференции «Современные проблемы фотобиологии» будут заслушаны 99 устных докладов, из них 19 – пленарных, также будут представлены 30 стендовых докладов. На X съезде будут подведены итоги работы РФО за 2021-2023 гг., кроме того, пройдут выборы президента, вице-президентов и центрального совета РФО.

Основные направления работы конференции:

1. Первичные процессы фотосинтеза
2. Регуляция фотосинтеза
3. Фоторецепция
4. Фундаментальные основы фотодинамической и лазерной терапии
5. Биофотоника молекул, наночастиц, клеток и тканей
6. Биoluminesценция и фотоника флуоресцентных белков
7. Фотосинтезирующие организмы как преобразователи солнечной энергии в биотоплива и ценные продукты
8. Экологическая фотобиология

В рамках конференции пройдет традиционный конкурс молодых ученых. В конкурсе примут участие молодые ученые в возрасте до 35 лет включительно, выступающие как с устными, так и со стендовыми докладами. Авторы лучших стендовых докладов получают возможность выступить с устным докладом.



Кроме того, Фонд «Развитие Химической Физики», занимающийся поддержкой молодых ученых, учредил премию (travel grant) участнику (студенту или аспиранту), представившему лучший научный устный или стендовый доклад на конференции «Современные проблемы фотобиологии». Размер премии составит 100 000 рублей.

Надеемся, что Х юбилейный съезд и конференция будут плодотворными и успешными, научные обсуждения приведут к новым творческим успехам и научным открытиям, к организации новых совместных работ научных коллективов, а также к повышению научного уровня молодых ученых. Желаем всем участникам активной и творческой работы, интересных дискуссий и хорошего настроения!

Председатель программного комитета
Президент РФО

А.А. Цыганков

Председатель организационного комитета
Вице-президент РФО

М.М. Борисова-Мубаракшина



ОРГАНИЗАТОРЫ

Организационный комитет:

Борисова-Мубаракишина Мария Мансуровна, д.б.н., председатель,
Институт фундаментальных проблем биологии РАН
Мамедов Махир Джафарович, д.б.н., зам. председателя,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Котова Елена Аврамовна, к.б.н., зам. председателя,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Ветошкина Дарья Васильевна, к.б.н., ученый секретарь,
Институт фундаментальных проблем биологии РАН
Надеева Елена Михайловна, к.б.н., секретарь,
Институт фундаментальных проблем биологии РАН

Члены оргкомитета:

Хасимов М.Х., Институт фундаментальных проблем биологии РАН
Стерелюхина И.Г., Институт фундаментальных проблем биологии РАН
Коровина Е.С., Институт фундаментальных проблем биологии РАН

Программный комитет:

Цыганков Анатолий Анатольевич, д.б.н., председатель,
Институт фундаментальных проблем биологии РАН

Члены программного комитета:

Семенов А.Ю., д.б.н.,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Проскураков И.И., д.ф.-м.н.,
Институт фундаментальных проблем биологии РАН
Иванов Б.Н., д.б.н., Институт фундаментальных проблем биологии РАН
Борисова-Мубаракишина М.М., д.б.н.,
Институт фундаментальных проблем биологии РАН



Сухов В.С., к.б.н., Нижегородский государственный университет
Коппель Л.А., к.б.н.,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Петровская Л.Е., к.х.н.,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Максимов Е.Г.,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Грин М.А., д.х.н., МИРЭА – Российский технологический университет
Красновский А.А., д.б.н., ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии
Тучин В.В., д.ф.-м.н., Саратовский национальный исследовательский
государственный университет имени Н.Г. Чернышевского
Надточенко В.А., д.х.н.,
ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН
Высоцкий Е.С., к.б.н., ФИЦ Красноярский Научный Центр СО РАН
Кратасюк В.А., д.б.н., Сибирский федеральный университет
Ломакина Г.Ю., к.б.н.,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Соловченко А.Е., д.б.н.,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Антал Т.К., д.б.н. Псковский Государственный Университет
Хрущев С.С.,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова



ПРОГРАММА КОНФЕРЕНЦИИ

11 СЕНТЯБРЯ, ПОНЕДЕЛЬНИК

8:00 – 8:50 Регистрация

8:50 – 9:00 Открытие Съезда и конференции «Современные проблемы фотобиологии»

СЕКЦИЯ «РЕГУЛЯЦИЯ ФОТОСИНТЕЗА»

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: *М.М. Борисова-Мубаракишина, В.С. Сухов*

9:00 – 9:30 **Татьяна Юрьевна Плюснина**, Математические подходы для оценки гетерогенности фотосистемы II

9:30 – 10:00 **Дарья Васильевна Ветошкина**, Взаимосвязь краткосрочного и долгосрочного адаптационных механизмов, регулирующих светосбор в высших растениях

10:00 – 10:30 **Борис Николаевич Иванов**, Карбоангидразы хлоропластов в адаптационных механизмах растений (on-line)

10:30 – 10:50 **Максим Михайлович Патрин**, Применение технологии фенотипирования для оценки эффективности фотосинтеза, ООО «Феномика»

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатель заседания: *В.В. Птушенко*

10:50 – 11:10 **Владимир Сергеевич Сухов**, Индуцированные электрическими сигналами системные ответы фотосинтеза: феноменология, множественные механизмы, математическое моделирование

11:10 – 11:30 *Кофе-брейк*

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: *Е.М. Надеева, А.В. Шитов*

11:30 – 11:50 **Дарья Александровна Ратницына**, Разработка и анализ математической модели при комбинированном влиянии абиотических факторов

11:50 – 12:10 **Екатерина Михайловна Сухова**, Теоретическое исследование возникновения неоднородности интенсивности фотосинтеза по поверхности листа растения (on-line)

12:10 – 12:30 **Александра Андреевна Анисина**, Анализ лимитирующих факторов фиксации CO₂ в листьях ячменя, выращенных на свету различного спектрального состава

12:30 – 12:50 **Мария Мансуровна Борисова-Мубаракшина**, Изменение функционирования пула пластохинона хлоропластов высших растений в стрессовых условиях

12:50 – 13:10 **Дарья Валентиновна Вильянен**, Пути окисления пула пластохинона в тилакоидах высших растений

13:10 – 14:00 Обед

14:00 – 14:40 Размещение стендов; Заседание оргкомитета с программным комитетом. Выдвижение и утверждение экспертов по оценке работ молодых ученых; утверждение правил выбора лучших работ молодых ученых (устных и постерных)

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: *В.В. Терентьев, Д.В. Ветошкина*

14:40 – 15:00 **Василий Витальевич Птушенко**, Продукция активных форм кислорода клетками микроводоросли *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047 при действии стрессовых факторов

15:00 – 15:20 **Людмила Федоровна Кабашникова**, Влияние LED-освещения разного спектрального состава на фотосинтетическую активность растений огурца при фузариозе

15:20 – 15:40 **Николай Владимирович Балашов**, Влияние пероксида водорода на протекание процесса state transitions у высших растений



15:40 – 16:00 **Юлия Александровна Немцова**, Оценка устойчивости растений ячменя к засухе и солевому стрессу по фотосинтетическим показателям-предикторам

16:00 – 16:20 **Василий Валерьевич Терентьев**, Получение и биохимические свойства рекомбинантной карбоангидразы САНЗ из *Chlamydomonas reinhardtii*

16:20 – 16:40 **Татьяна Петровна Хорошаева**, Локализация и характеристика бета карбоангидразы 5 из *Arabidopsis thaliana* (on-line)

16:40 – 17:00 **Александр Васильевич Шитов**, Карбоангидразная активность в функционировании фотосистемы 2 высших растений: современное состояние исследований

17:00 – 17:20 *Кофе-брейк*

17:20 – 19:00 **СТЕНДОВАЯ СЕССИЯ**

19:00 **Приветственный фуршет**

12 СЕНТЯБРЯ, ВТОРНИК

СЕКЦИЯ «БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ И ФОТОНИКА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ»

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: *Высоцкий Е.С., Кратасюк В.А.*

8:55 – 9:00 Открытие секции «Биоломинесценция и фотоника флуоресцентных белков»

9:00 – 9:30 **Елена Владимировна Немцева**, Роль диффузионного ограничения в эффектах сред на биоломинесцентную реакцию бактерий

9:30 – 9:55 **Евгений Степанович Высоцкий**, Структурные гомологи Ca^{2+} -регулируемых фотопротеинов. Способен ли апофотопротеин выполнять функции, не связанные с излучением света?

9:55 – 10:25 **Валентина Александровна Кратасюк**, От ферментативных биотестов до биосенсоров: методы, реагенты и приборы



10:25 – 10:55 **Галина Юрьевна Ломакина**, Возможности использования биоломинесцентной системы светляков *Luciola mingrelica* в биомедицинских исследованиях

10:55 – 11:20 **Надежда Степановна Кудряшева**, Биоломинесцентный мониторинг низкодозовых радиационных воздействий

11:20 – 11:40 *Кофе-брейк*

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: *Кудряшева Н.С., Ломакина Г.Ю.*

11:40 – 12:00 **Павел Викторович Наташин**, Целентерамин как основной продукт биоломинесцентной реакции: структурные исследования

12:00 – 12:20 **Никита Олегович Ронжин**, Обнаружение стимулятора свечения *in vivo* высшего гриба *Neonothopanus nambi*

12:20 – 12:40 **Людмила Петровна Буракова**, Фотостабильный рекомбинантный фотопротейн беровин с оптимумом активации при физиологических условиях

12:40 – 13:00 **Елена Владимировна Еремеева**, Кинетические и спектральные характеристики продуктов биоломинесцентной реакции Ca²⁺-регулируемых фотопротейнов – целентерамида и целентерамина

13:00-14:00 Обед

14:00 – 15:00 **СТЕНДОВАЯ СЕССИЯ**

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: *Еремеева Е.В., Буракова Л.П.*

15:00 – 15:20 **Марина Дмитриевна Ларионова**, Рациональный дизайн люциферазы Renilla с использованием методов молекулярного моделирования

15:20 – 15:40 **Андрей Сергеевич Николаев**, Создание палитры генетически кодируемых флуоресцентных меток на основе LOV-домена

15:40 – 16:00 **Екатерина Дмитриевна Посохина**, Биоломинесцентный анализ гиспидина в экстрактах из природной и лабораторно полученной биомассы базидиомицета *Inonotus obliquus* (Чага)



16:00 – 16:20 **Екатерина Сергеевна Сушко**, Влияние фуллеренолов разной структуры на бактериальную биолюминесценцию

16:20 – 16:40 **Екатерина Дмитриевна Посохина**, Уникальные особенности люминесцентного гриба *Mycena gombakensis*

16:40 – 17:00 **Людмила Васильевна Степанова**, Биолюминесцентный анализ слюны для оценки функционального состояния организма

17:00 – 17:20 *Кофе брейк*

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: *Немцева Е.В., Ларионова М.Д.*

17:20 – 17:40 **Олег Сергеевич Сутормин**, Интегральная оценка токсичности ПАВ на ферментативные и клеточные тест-системы

17:40 – 18:00 **Арина Геннадьевна Кичеева**, Влияние наночастиц магнетита на биолюминесценцию (on-line)

18:00 – 18:20 **Светлана Сергеевна Каминская**, Использование биолюминесцентной тест-системы на основе живых клеток *E. coli* для изучения эффективности действия антибактериальных препаратов разных классов и их композиций

18:20 – 18:40 **Владислава Владимировна Малышева**, Интегральный биолюминесцентный показатель – индикатор физической нагрузки организма спортсмена



13 СЕНТЯБРЯ, СРЕДА

**СЕКЦИЯ «ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИЕ ОРГАНИЗМЫ КАК
ПРЕОБРАЗОВАТЕЛИ СОЛНЕЧНОЙ ЭНЕРГИИ В БИОТОПЛИВА
И ЦЕННЫЕ ПРОДУКТЫ»
ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ**

Председатели заседания: *А. Боровков, А. Лелеков*

8:55 – 9:00 Открытие секции

9:00 – 9:30 **Алексей Евгеньевич Соловченко**, Флуоресценция хлорофилла – универсальный инструмент мониторинга культур микроводорослей

9:30 – 10:00 **Анатолий Анатольевич Цыганков**, Фотосинтезирующие пурпурные бактерии и их практическая значимость

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: *А. Цыганков, А. Соловченко*

10:00 – 10:20 **Александр Сергеевич Лелеков**, Двухкомпонентная модель динамики биохимического состава биомассы микроводорослей

10:20 – 10:40 **Андрей Борисович Боровков**, Стабильность фикобилипротеинов при их хранении в водно-спиртовом растворе

10:40 – 11:00 **Евгений Анатольевич Лысенко**, Тепловой шок и фотосистемы 1 и 2: Не всё так однозначно

11:00 – 11:20 **Вера Игоревна Гречаник**, Адаптация фотоавтотрофных культур микроводорослей к недостатку элементов питания.

11:20-11:40 *Кофе-брейк*

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: *Т. Козлова, Е. Лысенко*

11:40 – 12:00 **Полина Александровна Старыгина**, Интенсивное культивирование пурпурных несерных бактерий.



12:00 – 12:20 **Ольга Олеговна Чудакова**, Метод комплексного выделения биологически значимых соединений из биомассы пурпурных несерных бактерий

12:20 – 12:40 **Татьяна Андреевна Козлова**, Влияние абсцизовой кислоты на рост, профиль жирных кислот и пигментный состав микроводоросли *Chlorella (Chromochloris) zofingiensis* (Chlorophyte) и ее сопутствующего микробиома

12:40 – 13:00 **Махмадюсуф Хусейнович Хасимов**, Выделение из *Thiocapsa bogorovii* комплекса, восстанавливающего серу до сероводорода в присутствии молекулярного водорода

13:00 – 14:00 Обед

14:00 – 15:00 **СТЕНДОВАЯ СЕССИЯ**

СЕКЦИЯ «ФОТОРЕЦЕПЦИЯ»

ПЛЕНАРНЫЙ ДОКЛАД

Председатель заседания: *К. Неверов*

15:00 – 15:30 **Иван Юрьевич Гуцин**, Фотоактивация и радиационные повреждения доменов LOV

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: *И. Гуцин, Л. Петровская*

15:30 – 15:50 **Лариса Алексеевна Коппель**, Фитохром А стимулирует накопление протохлорофиллида в проростках *Arabidopsis* при предосвещении семян

15:50 – 16:10 **Константин Викторович Неверов**, Фотохимическая активность димеров хлорофилла в белках семейства WSCP

16:10 – 16:30 **Анатолий Эдуардович Михайлов**, Фоторецепция в носителях генов родопсинов с мотивом DTG/DTS

16:30 – 16:50 **Федор Михайлович Цыбров**, Механизм обратного транспорта протона в микробных родопсинах.



16:50 – 17:10 **Лада Евгеньевна Петровская**, Механизм репротонирования основания Шиффа в ретинальном белке *Exiguobacterium sibiricum* и его роль в эффективности фотоиндуцированного транспорта протонов

17:10 – 17:30 *Кофе брейк*

17:30 – 19:00 **Съезд РФО: отчет о проделанной работе, выборы президента, вице-президентов, ЦС и исполнительного комитета**

14 СЕНТЯБРЯ, ЧЕТВЕРГ

СЕКЦИЯ «ПЕРВИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ ФОТОСИНТЕЗА»

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: *А. Забелин*

8:55 – 9:00 Открытие секций

9:00 – 9:30 **Дмитрий Александрович Черепанов**, Фемтосекундная релаксационная динамика возбужденных состояний хлорофиллов a, b и d в пигмент-белковых комплексах и растворах (on-line)

9:30 – 10:00 **Алексей Юрьевич Семенов**, Роль длинноволновых форм хлорофилла в переносе энергии и разделении зарядов в пигмент-белковых комплексах фотосистем 1 и 2 цианобактерий

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: *А. Семенов*

10:00 – 10:20 **Александр Александрович Красновский**, Фотогенерация и тушение синглетного молекулярного кислорода бактериальными S40 каротиноидами (on-line)

10:20 – 10:40 **Алексей Александрович Забелин**, Сайт-направленное химическое замещение хромофоров: применение для исследования механизма первичного разделения зарядов в реакционном центре *Chloroflexus aurantiacus*



10:40 – 11:00 **Наталья Евгеньевна Беляева**, Электрохимический контроль переноса электронов в тилакоидных мембранах водоросли и цианобактерии: моделирование сигналов индукции флуоресценции и P700 с учетом переходов состояний.

11:00 – 11:20 **Георгий Евгеньевич Милановский**, Экситонные взаимодействия тетрамера хлорофилла *a* в водорастворимом хлорофилл-связывающем белке BoWSCP

11:20 – 11:40 *Кофе-брейк*

Председатели заседания: *Н. Беляева, Г. Милановский*

11:40 – 12:00 **Анастасия Александровна Петрова**, Фотосинтез на дальнем красном свете: разделение зарядов и перенос электрона в уникальной фотосистеме 1 из цианобактерии *Acaryochloris marina*

12:00 – 12:20 **Анна Игоревна Вишневская**, Кинетика переноса электрона в фотосистеме 1 в условиях фазового перехода окружающей белок системы (on-line)

12:20 – 13:00 **Максим Александрович Ситников**, мастер-класс «Возможности системы фенотипирования Phenospex Microscan для анализа спектральных и морфологических характеристик растений»
ООО «Феномика»

13:00 – 13:40 Обед

СЕКЦИЯ «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ И ЛАЗЕРНОЙ ТЕРАПИИ»

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: *С. Летута*

13:40 – 14:10 **Михаил Александрович Грин**, Разработка таргетных лекарственных препаратов на основе природных хлоринов для терапии и диагностики в онкологии

14:10 – 14:40 **Елена Вячеславовна Филоненко**, Возможности клинического применения фотодинамической терапии в онкологии (on-line)

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: *Грин М.А.*

14:40 – 15:00 **Евгений Михайлович Глебов**, Первичные процессы в фотофизике и фотохимии комплексов платиновых металлов, перспективных для применения в фотохимиотерапии

15:00 – 15:20 **Анна Петровна Баврина**, Влияние широполосного красного света на предикторы воспаления у животных с моделью миофасциальных триггерных точек (on-line)

15:20 – 15:40 **Анастасия Алексеевна Горохова**, Анализ условий развития окислительного стресса в клетках-свидетелях при фотодинамическом воздействии (on-line)

15:40 – 16:00 **Кирилл Сергеевич Ершов**, Влияние молекулярного окружения на фотообразование синглетного кислорода

16:00 – 16:20 **Дарья Дмитриевна Зыкова**, Адсорбция окта-катионных комплексов фталоцианина, различающихся ионом металла в центре молекулы, на липидной мембране

16:20 – 16:40 **Валерия Валериевна Кардумян**, Влияние амфифильных полимеров на фотогенерацию синглетного кислорода в присутствии метиленового синего в модельных условиях и в условиях *in vivo*.

16:40 – 17:00 **Анна Николаевна Константинова**, Катионные комплексы фталоцианина на бислоидной липидной мембране: влияние структуры на их адсорбцию и фотодинамическую активность

17:00 – 17:20 *Кофе брейк*

Председатели заседания: *Е. Глебов*

17:20 – 17:40 **Любовь Владимировна Крылова**, Оценка эффективности противоопухолевого агента с комбинированным фотодинамическим и таргетным действием



17:40 – 18:00 **Нина Николаевна Пескова**, Вторичная продукция H_2O_2 в опухолевых клетках после фотодинамического воздействия с фотосенсибилизаторами различной локализации

18:00 – 18:20 **Владимир Егорович Прокопьев**, Сезонный и 11-летний циклический характер вирусных заболеваний

18:20 – 18:40 **Елена Святославна Тучина**, Штаммовые различия устойчивости *Staphylococcus aureus* к фотодинамическому воздействию

18:40 – 19:00 **Владимир Аркадьевич Коршун**, Амфипатические фотогенераторы синглетного кислорода ингибируют репродукцию оболочечных вирусов

19:00 – 19:20 **Александр Михайлович Фирсов**, Молекулярный наномотор является фотосенсибилизатором, способным вызывать фотодинамическое повреждение липидных мембран

15 СЕНТЯБРЯ, ПЯТНИЦА

СЕКЦИЯ «БИОФОТОНИКА МОЛЕКУЛ, НАНОЧАСТИЦ, КЛЕТОК И ТКАНЕЙ»

8:55 – 9:00 Открытие секции

ПЛЕНАРНЫЕ ЛЕКЦИИ

Председатели заседания: *Е. Соловьева, А. Залесский*

9:00 – 9:30 **Виктор Андреевич Надточенко**, Методы фемтосекундной лазерной спектроскопии в исследовании первичных процессов фотосинтеза

9:30 – 10:00 **Диана Владимировна Южакова**, Разработка персонализированного подхода к оценке эффективности иммунотерапии опухолей на основе технологии метаболического флуоресцентного времяразрешённого имиджинга

10:00 – 10:30 **Алла Борисовна Бучарская**, Комбинированная фотодинамическая и плазменная фототермическая терапия в модели крыс с перивитыми опухолями (on-line)

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: *В. Надточенко, Н. Малюченко*

10:30 – 10:50 **Роман Юрьевич Пищальников**, Применение эволюционных алгоритмов для моделирования оптического отклика фотосинтетических пигментов и пигмент-белковых комплексов

10:50 – 11:10 **Валерий Сергеевич Соколов**, Адсорбция и кинетика функционирования фоточувствительного соединения, освобождающего протоны на поверхности липидной мембраны

11:10 – 11:25 *Кофе-брейк*

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

11:25 – 11:45 **Алексей Игоревич Кононов**, Экспериментально-теоретическое исследование сверхбыстрой динамики возбужденных состояний тетрагидробиоптерина

11:45 – 12:05 **Андрей Андреевич Буглак**, Экспериментально-теоретическое исследование наноструктур серебра и золота как наносенсоров для детекции биомолекул

12:05 – 12:25 **Иоанна Алексеевна Горбунова**, Время-разрешенная флуоресценция NAD(P)H в смеси естественных флуоресцентных ферментативных комплексов.

12:25 – 12:45 **Анна Александровна Жихорева**, Исследование процессов накопления фотосенсибилизатора Радахлорин в клетках с помощью время-разрешенной флуоресцентной микроскопии

12:45 – 13:05 **Василиса Олеговна Свинко**, Исследование оптических свойств цианиновых красителей в растворах аминокислотсодержащих полимеров, используемых в биометках и микрокапсулах

13:05 – 14:40 Обед

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: *А. Кононов, Д. Южакова*

14:40 – 15:00 **Александр Дмитриевич Залесский**, Фемтосекундный лазерный скальпель как инструмент для слияния клеток



15:00 – 15:20 **Наталья Валериевна Малюченко**, spFRET-микроскопия в исследованиях взаимодействия перспективных противоопухолевых соединений с нуклеосомами

15:20 – 15:40 **Алина Анатольевна Осыченко**, Деструкция метафазной пластинки в ооцитах мыши с использованием фемтосекундного лазерного излучения

15:40 – 16:00 **Алексей Александрович Смирнов**, Фотофизические свойства гибридных систем тераностики на основе наночастиц золота и порфиринов: флуоресцентный отклик и генерация синглетного кислорода

16:00 – 16:20 **Елена Викторовна Соловьева**, Мультифункциональные агенты биовизуализации, гипертермальной и фотодинамической терапии на основе анизотропных наночастиц золота

16:20 – 16:40 **Алиса Игоревна Шевчук**, Приложение спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния к исследованию фолиевой кислоты внутри клеток

16:40 – 17:00 **Артём Александрович Астафьев**, Фемтосекундный лазерный синтез флуоресцентных углеродных точек из протеиногенных аминокислот

17:00 – 17:20 *Кофе брейк*

17:20 – 19:00 **СТЕНДОВАЯ СЕССИЯ**



16 СЕНТЯБРЯ, СУББОТА

СЕКЦИЯ «ЭКОЛОГИЯ И ФОТОБИОЛОГИЯ»

8:55 – 9:00 Открытие секции

ПЛЕНАРНЫЕ ЛЕКЦИИ

Председатели заседания: *И. Конохов, С. Хрущев*

9:00 – 9:30 **Тарас Корнелиевич Антал**, Новые приборы для биотестирования и биоиндикации

9:30 – 10:00 **Елена Алексеевна Лабунская**, Связь спектрального состава света в мезомиктических водоемах на побережье Белого моря с пигментным составом фототрофов в зоне хемоклина

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: *Т. Антал, Т. Плюснина*

10:00 – 10:20 **Геннадий Александрович Булаткин**, Анализ вклада зеленого лесного покрова и методов использования древесины в баланс углекислоты в земной атмосфере (on-line)

10:20 – 10:40 **Иван Владимирович Конохов**, Комплекс FRR (fast repetition rate) флуориметров для оценки состояния растений в природной среде и фотобиореакторах

10:40 – 11:00 **Сергей Сергеевич Хрущев**, Разработка математических моделей для анализа функционального состояния фотосинтетического аппарата растений и водорослей по данным оптических измерений для экологического мониторинга

11:00 – 11:20 **Алена Александровна Волгушева**, Влияние 2,3',4,4',6-пентахлорбифенила на рост и фотосинтетическую активность зеленой микроводоросли *Chlorella sorokiniana*

11:20 – 11:40 *Кофе-брейк*

11:40 – 12:00 **Любовь Михайловна Юдина**, Сравнительная оценка физиологических ответов на умеренные локальные стрессоры у растений пшеницы, выращенных в лабораторных и естественных условиях



12:00 – 12:20 **Александра Николаевна Никулина**, Влияние
УФ-излучения на бактериофаги с неканоническими основаниями,
выделенными из сточных вод г. Пущино (on-line)

12:20 – 13:00 **Заседание комиссии по подведению итогов конкурса
молодых ученых**

13:00 – 15:00 Обед

15:00 – 17:00 **Выступления молодых ученых, представивших лучшие
постерные доклады, награждение победителей конкурса молодых
ученых**

17:00 – 18:30 **Закрытие съезда и конференции**

19:00 **Товарищеский ужин**

СТЕНДОВАЯ СЕССИЯ

Секция 1 «Первичные процессы фотосинтеза»

Марк Пасхин, Денис Яныкин, Максим Асташев, Дмитрий Серов
Определение кинетики светового/теплового повреждения фотосистемы II с помощью ультразвуковой интерферометрии фиксированной длины

Дмитрий Серов, Максим Асташев, Марк Пасхин, Денис Яныкин
Применение ультразвуковой спектрометрии для оценки влияния поверхностно активных веществ на модельные мембраны (on-line)

Секция 2 «Регуляция фотосинтеза»

Александр Ашихмин, Максим Большаков, Александра Худякова, Владимир Креславский, Павел Пашковский, Михаил Верещагин, Анатолий Кособрухов

Роль каротиноидов и флавоноидов в адаптации мутантных растений *Solanum lycopersicum* с высоким и низким содержанием пигментов к свету высокой интенсивности

Анастасия Бражникова, Николай Балашов, Илья Найдов, Мария Борисова-Мубаракшина

Влияние изменений содержания альтернативной оксидазы митохондрий на фотосинтетические параметры высших растений при пониженной температуре

Татьяна Виск, Людмила Кабашникова

Влияние патогенного гриба *Bipolaris sorokiniana* на состав хлорофилловых пигментов в листьях проростков ярового ячменя

Роман Маркин, Николай Балашов, Мария Борисова-Мубаракшина, Дарья Ветошкина, Борис Иванов

Изменение функционирования антенны фотосистемы 2 в высших растениях при действии засухи и засоления

Елена Надеева, Людмила Игнатова, Наталья Руденко, Дарья Ветошкина, Борис Иванов

Влияние нокаута альфа-карбоангидразы 2 на нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a* в *Arabidopsis thaliana*

Алёна Попова, Юрий Золин, Екатерина Сухова, Владимир Сухов, Любовь Юдина

Влияние электрических сигналов, вызванных локальным воздействием света и нагрева у пшеницы яровой на фотосинтетические параметры при выращивании в условиях открытого грунта при поливе и засухе

Оксана Птушенко, Е.С. Глаголева, Е.С. Лобакова, В.В. Птушенко, А.Е. Соловченко, К.А. Шибзухова

Влияние стрессовых факторов разной природы на индукцию нефотохимического тушения в клетках микроводоросли *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047 при акклимации к низкой температуре

Екатерина Пыхова, Дарья Вильянен, Мария Борисова-Мубаракшина, Марина Козулева

Установление механизмов фотоингибирования активности фотосинтетической электрон-транспортной цепи высших растений

Юлия Рыжих, Василий Терентьев, Дарья Ветошкина

Регуляция state transitions при повышении освещенности у *Chlamydomonas reinhardtii*

Анна Шукшина, Василий Терентьев

Влияние рекомбинантного белка САНЗ на устойчивость фотосистемы 2 из *Chlamydomonas reinhardtii* к фото- и термоинактивации

Секция 3 «Фоторецепция»

В.А. Большаков, Л.Е. Петровская, Е.А. Крюкова, Е.П. Лукашев, С.А. Силецкий

Гибридные белки, обеспечивающие направленную ориентацию ретинального белка в протеолипосомах

Антонина Буханько, Георгий Цораев, Глеб Будылин, Евгений Ширшин, Юрий Слонимский, Николай Случанко, Дмитрий Черепанов, Ярослава Шакина, Андрей Рубин, Евгений Максимов

Исследование молекулярных основ механизмов адаптации цианобактерий к изменению интенсивности света

А.Е. Донцов, М.А. Яковлева*, М.А. Островский

Свето-индуцированная генерация радикалов супероксида продуктами окислительной деструкции меланосом из клеток ретинального пигментного эпителия глаза человека

Александра Сафинова, Николай Беликов, Лада Петровская, Алексей Лукин, Ольга Демина, Сергей Варфоломеев, Андрей Ходонов

Исследование спектральных свойств модели хромофорного центра бактериальных родопсинов и искусственных пигментов на его основе

Секция 4 «Фундаментальные основы фотодинамической
и лазерной терапии»

Андрей Белашов, Анна Жихорева, Иоанна Горбунова, Максим Сасин, Ирина Семенова, Олег Васютинский

Исследование изменений фотофизических характеристик фотосенсибилизатора Радахлорин при его добавлении в культуральную среду DMEM

Азамат Ишемгулов, Сергей Летуга, Марина Сенчукова

Оценка уровня тканевого кислорода по замедленной флуоресценции зонда

Нина Пескова, Анастасия Горохова, Наталья Шилигина, Анна Брилкина, Ирина Балалаева

Вторичная продукция H_2O_2 в опухолевых клетках после фотодинамического воздействия с фотосенсибилизаторами различной локализации

Секция 5 «Биофотоника молекул, наночастиц, клеток и тканей»

Е.С. Горленко, Л.В. Саковина, Е.В. Иванская, Д.С. Новопашина

Подходы к фоторегулируемому направленному расщеплению ДНК нуклеазой Cas9 с использованием фотомодифицированных олигонуклеотидов

Андрей Деменьшин, Мария С. Истомина, Елена В. Соловьева

Опыт *in vivo* флуоресцентной и компьютерной томографии с наночастицами золота в качестве контрастного агента

Д.Ю. Мартиросян, А.А. Осыченко, А.Д. Залесский,

У.А. Точило, В.А. Надточенко

Изучение возможностей лазерной нанохирургии для слияния соматических клеток.

Секция 6 «БиOLUMИнесценция и фотоника флуоресцентных белков»

Дарья Бодунова, Даниил Гвоздев, Олеся Букач, Евгений Максимов

Изучение конформационной подвижности хромофоров аллофикоцианина путем измерения антистоксовой флуоресценции

Дмитрий Гульнов, Елена Немцева, Наталья Родионова, Валентин Петушков

Спектрально-люминесцентные характеристики активатора биолюминесцентной реакции сибирских энхитреид *Henlea sp.*

Каминская С.С., Ломакина Г.Ю., Верная О.И., Шумилкин А.С.

Использование биолюминесцентной тест-системы на основе живых клеток *E. coli* для изучения эффективности действия антибактериальных препаратов разных классов и их композиций

Л.В. Степанова, В.А. Кратасюк, О.А. Коленчукова, Г.В. Жукова

Биолюминесцентный анализ слюны работников железнодорожного транспорта для мониторинга состояния организма при трудовой нагрузке.

Секция 7 «Фотосинтезирующие организмы как преобразователи солнечной энергии в биотоплива и ценные продукты»

Полина Старыгина, Ольга Чудакова, Анатолий Цыганков

Интенсивное культивирование пурпурных несерных бактерий

Секция 8 «Экологическая фотобиология»

Юрий Золин, Екатерина Сухова, Любовь Юдина, Алёна Попова, Анастасия Киор, Владимир Сухов

Влияние водного дефицита на параметры типичного и модифицированных PRI

А.В. Иванова, Ю.А. Немцова, В.А. Воденеев, М.А. Гринберг

Влияние хронически действующего ионизирующего излучения на индуцированную электрическими сигналами устойчивость к засухе у растений пшеницы

Лариса Коппель, Елена Краснова

Изучение многокомпонентной смеси пигментов микроводорослей из морского меро-миктического озера Кисло-Сладкое методом низкотемпературной флуоресценции

Ольга Яковлева, Дарья Тодоренко, Алексей Глинушкин, Дмитрий Маторин

Флуоресценция хлорофилла растений липы и березы в городских условиях

Секция 1. ПЕРВИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ ФОТОСИНТЕЗА

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ В ТИЛАКОИДНЫХ МЕМБРАНАХ ВОДОРОСЛИ И ЦИАНОБАКТЕРИИ: МОДЕЛИРОВАНИЕ СИГНАЛОВ ИНДУКЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ И P700 С УЧЕТОМ ПЕРЕХОДОВ СОСТОЯНИЙ

Electrochemical control of electron transport in thylakoid membranes of microalga and cyanobacterium: modeling of fluorescence and P700 induction signals with an account for state 2–state 1 transitions

Наталья Беляева, Александр Булычев,
Галина Ризниченко, Андрей Рубин*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Биологический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

**e-mail: natalmurav@yandex.ru*

Для реакционных центров (РЦ) фотосинтезирующих клеток цианобактерий (прокариоты) и микроводорослей (эукариоты) характерна эволюционная консервативность их структурных элементов. Известны результаты количественных исследований параметров светоиндуцированного переноса электронов (ПЭ) по редокс кофакторам РЦ фотосистем 2 и 1 (ФС2 и ФС1) в сопряжении с переносом протонов H^+ (ПП), включая мембранный пул PQ/PQH₂ и комплекс цитохрома *b₆f* [цит *b₆f*] [1-3]. Формирование редокс эквивалентов ферредоксина (Fd/Fd_r) и NADP/NADPH связано с линейным и циклическим потоками электронов, работа которых зависит от параметров пассивного (утечки) и активного (АТФаза) переноса H^+ в тилакоидных мембранах (ТМ) различных организмов. С помощью расчетов в модели мембраны тилакоида [2,3] нами были получены обобщенные параметры ПЭ/ПП и энергизации мембраны в потоке квантов света. Будучи физиологически оправданы, найденные величины позволили фитировать вычисления по световым сигналам индукции флуоресценции (ИФ) и P700 редокс переходов. Использованы измерения ИФ, проведенные в интервалах от микросекунд, для микроводоросли *Scenedesmus obliquus* до минут, а для цианобактерии *Synechocystis* PCC 6803 вместе с переходами P700⁺ катион радикала - до 100 с. Путем фитирования кинетически различных паттернов ИФ *Scenedesmus*, *Synechocystis* (включая кинетику P700⁺) выявлены отличия в стехиометрии двух типов ТМ, ранее отмеченные для хлоропластов и

цианобактерий [1]. Более того, величины пассивных утечек (V_{H+}) и активного потребления в реакции АТФазы ($V_{АТФ}$) энергии, запасенной в форме *pmf* (протон движущей силы), отличаются для изученных ТМ *Scenedesmus* и *Synechocystis*. Результаты подтверждены вычислениями в модели ТМ с учетом вариабельности антенн, передающих энергию световых квантов в РЦ ФС2 за счет ФС1 с увеличением выхода флуоресценции при описании регуляции state transition, обусловленной редокс состоянием пула хинонов. Далее, было проверено, в какой степени кинетические стадии сигналов, измеренных при световой индукции образцов, чувствительны к модификациям в допустимых диапазонах величин V_{H+} и $V_{АТФ}$. Динамическое поведение быстрой ОЛПС волны ИФ на стадиях ОЛР нарастания было неизменным при условии таких вариаций. Однако, фаза PS спада происходила быстрее и в большей степени, при снижении скорости срабатывания АТФазы. При этом отмечено снижение амплитуды медленной SMT волны ИФ. Такое тушение может быть связано с закислением люмена, ответственным за NPQ. Дальнейший модельный анализ заполнения электронами гемов цит *bf* в условиях действия света разной интенсивности актуален для изучения длительных сигналов индукции фотосинтеза.

1. Stirbet A, Lazár D, Papageorgiou GC, Govindjee (2019) In: Cyanobacteria: From Basic Science to Applications Mishra AK, Tiwari DN, Rai AN, eds. Academic Press, Elsevier, 79-130
2. Belyaeva N, Bulychev A, Riznichenko G, Rubin A (2019) Photosynth Res 140:1-19.
3. Belyaeva NE, Bulychev AA, Pashchenko VZ, Klementyev KE, Ermachenko PA, Konyukhov IV, Riznichenko GYu, Rubin AB (2022) Dynamics of processes in thylakoid membranes of algae in vivo. Biophysics. 2022. Vol. 67. No. 5. pp. 708-725

**УЧАСТИЕ КАРОТИНОИДОВ В ОБРАЗОВАНИИ АКТИВНЫХ ФОРМ
КИСЛОРОДА И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СО СВЕТОСОБИРАЮЩИМИ
ПИГМЕНТ-БЕЛКОВЫМИ КОМПЛЕКСАМИ LH2 ПУРПУРНОЙ СЕРНОЙ
БАКТЕРИИ *Ectothiorhodospira (Ect.) haloalkaliphila***

**Participation of carotenoids in the production of reactive oxygen species and their
interaction with light-harvesting pigment-protein complexes LH2 of purple sulfur
bacterium *Ectothiorhodospira (Ect.) haloalkaliphila***

Максим Большаков, Александр Ашихмин, Денис Яныкин,
Александр Стародубов, Марк Пасхин*

Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии
наук – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, 142290 Пущино,
Московской обл., ул. Институтская 2; факс: 8 496 7330532

**e-mail: lfbv22@gmail.com*

Ранее было предположено, что каротиноиды в светособирающих комплексах LH2 способны генерировать синглетный кислород, который далее окисляет бактериохлорофилл до 3-ацетил хлорофилла [1,2]. Целью данной работы было получение доказательств генерации активных форм кислорода в комплексах LH2 пурпурных серных бактерий при освещении их светом, поглощаемым каротиноидами (420-540 нм) и выяснение молекулярных основ данного процесса. Было выявлено, что освещение светособирающих комплексов LH2 пурпурных серных бактерий *Ectothiorhodospira (Ect.) haloalkaliphila* светом в области поглощения каротиноидов (в отличие от освещения в области поглощения бактериохлорофилла) приводит к поглощению молекулярного кислорода, которое сопровождается образованием гидропероксидов органических молекул в комплексах. Показано, что освещение вызывает повреждение светособирающих комплексов. С одной стороны, наблюдается фотовыцветание бактериохлорофилла и уменьшение интенсивности его флуоресценции. С другой стороны, фотиндуцированное увеличение гидродинамического радиуса LH2, уменьшение термостабильности LH2 и изменение интенсивности флуоресценции при $\lambda_{em} \approx 440$ нм свидетельствуют о конформационных изменениях, происходящих в белковых молекулах комплексов. Ингибирование вышеописанных процессов при добавлении тушителей синглетного кислорода может свидетельствовать в пользу гипотезы о том, что каротиноиды в светособирающих комплексах LH2 способны генерировать синглетный кислород. Значимость полученных результатов выходит за рамки

конкретного исследования, а полученные результаты будут новым словом в бактериальном фотосинтезе, фотобиологии и свойствах каротиноидов, поскольку в настоящее время каротиноиды связывают с тушением, а не с генерацией АФК.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-24-00362).

1. Махнева, З.К.; Ашихмин, А.А.; Большаков, М.А.; Москаленко, А.А. Выделение синглетного кислорода мембранами пурпурных фотосинтезирующих бактерий при облучении светом происходит при возможном участии каротиноидов. *Микробиология* **2020**, *89*, 169–179, doi:10.31857/S0026365620010097.

2. Makhneva, Z.K.; Bolshakov, M.A.; Moskalenko, A.A. Carotenoids Do Not Protect Bacteriochlorophylls in Isolated Light-Harvesting LH2 Complexes of Photosynthetic Bacteria from Destructive Interactions with Singlet Oxygen. *Molecules* **2021**, *26*, 5120, doi:10.3390/molecules26175120.

**КИНЕТИКА ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА В ФОТОСИСТЕМЕ I В УСЛОВИЯХ
ФАЗОВОГО ПЕРЕХОДА ОКРУЖАЮЩЕЙ БЕЛОК СИСТЕМЫ**

Kinetics of electron transfer in photosystem I undergoing phase transition

*Анна Вишневецкая**, Алексей Семёнов, Георгий Милановский

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ,
Москва, Россия

*e-mail: ai.vish@yandex.ru, тел. +7 916 3931127

Кинетика редокс-превращений P_{700}^{+} в фотосистеме I (ФС1) была изучена в условиях ограниченной конформационной подвижности при переходе через точку стеклования среды при температурах, близких к комнатной. Редокс-превращения P_{700}^{+} изучались методом лазерной импульсной абсорбционной спектроскопии с микросекундным временным разрешением. Были выявлены особенности рекомбинации зарядов в ФС1 в зависимости от фазового состояния и температуры окружающей системы в пересыщенном растворе трегалозы и в стекловидных матрицах трегалозы при различной влажности.

Как в растворе трегалозы, так и в дегидратированных трегалозных матрицах наблюдалась гетерогенность реакций рекомбинации, описанная ранее при понижении температуры ниже 170 К в водно-глицериновой смеси [1] и при дегидратации трегалозных стёкол при различной влажности [2]. Эта работа позволила сравнить влияние фазового состояния окружающей ФС1 системы и температурные эффекты на перенос электрона в ФС1. Кроме того, из температурных зависимостей была определена энергия активации E_a компонент рекомбинации электрона с разных кофакторов системы.

В образцах ФС1, выдержанных в трегалозных матрицах при 43-55% влажности, удалось достичь стеклования системы при температурах, близких к комнатной. При этом было показано, что температурная зависимость реакций рекомбинации зарядов ярко выражена только в растворах и в стекловидных матрицах при температурах выше температуры стеклования. Кроме того, при температурах выше точки стеклования увеличивается вклад более медленных компонент, связанных с рекомбинацией с железосерных кластеров F_A/F_B , в то время как в стекловидных матрицах ниже точки стеклования основной вклад принадлежит быстрой компоненте рекомбинации, предположительно

связанной с ускоренной рекомбинацией с F_x или рекомбинацией с A_{1A} . Увеличение вязкости пересыщенного раствора трегалозы также влияет на кинетику переноса электрона, несмотря на то, что в этом случае фазового перехода не происходит.

Таким образом показано, что фазовое состояния системы влияет на реакции прямого и обратного переноса электрона в ФС1, останавливая перенос на терминальные железосерные кластеры при низкой конформационной подвижности окружения.

Работа была поддержана фондом РНФ (грант №23-74-00025).

1. Milanovsky G. et al. (2019) BBA-Bioenergetics. 1860(№ 8):601–610.
2. Malferrari M. et al. (2016) BBA-Bioenergetics. 1857(№ 9):1440–1454.

**САЙТ-НАПРАВЛЕННОЕ ХИМИЧЕСКОЕ ЗАМЕЩЕНИЕ ХРОМОФОРОВ:
ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМА ПЕРВИЧНОГО
РАЗДЕЛЕНИЯ ЗАРЯДОВ В РЕАКЦИОННОМ ЦЕНТРЕ
*CHLOROFLEXUS AURANTIACUS***

**Site-directed chemical exchange of chromophores: application to study the
mechanism of primary charge separation in the reaction center of
*Chloroflexus aurantiacus***

Алексей Забелин*, Антон Христин, Вячеслав Ковалев,
Равиль Хатыпов, Анатолий Шкуронатов

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 142290 Пушкино,
Московская область

*e-mail: zabelin.bio@gmail.com, тел. 8 496 7732680

В настоящее время становится общепринятой модель, согласно которой фотоиндуцированное разделение зарядов в РЦ пурпурных бактерий происходит по двухступенчатому механизму $P^* \rightarrow P^+B_A^- \rightarrow P^+H_A^-$ с начальным переносом электрона с синглетно-возбужденного первичного донора электрона, димера молекул бактериохлорофилла а (БХл), P^* на молекулу мономерного БХл B_A с образованием ион-радикального состояния $P^+B_A^-$ и с последующим электронным переносом с B_A^- на молекулу бактериофеофитина а (БФео) H_A с генерацией состояния $P^+H_A^-$. Считается, что особую роль в этом механизме играет остаток тирозина M210, специфическая ориентация диполя гидроксила которого стабилизирует состояние $P^+B_A^-$. Однако остается неясным, является ли такой механизм единственным и универсальным в бактериальном фотосинтезе. В этой связи особый интерес представляют РЦ зеленой нитчатой фотосинтетической бактерии *Chloroflexus (Cfl.) aurantiacus*, которые, с одной стороны, близки к РЦ *Rhodobacter (Rba.) sphaeroides* по глобальной геометрии расположения кофакторов и общей фотохимии, но, с другой стороны, отличаются по составу пигментов и не содержат ряд аминокислотных остатков, функционально важных для РЦ *Rba. sphaeroides*. В частности, тирозин M210 в РЦ *Cfl. aurantiacus* замещен на неполярный лейцин, не способный стабилизировать пару $P^+B_A^-$ в этих РЦ. Выполненные ранее фемтосекундные измерения на нативных препаратах РЦ *Cfl. aurantiacus*, однако, не позволили сделать однозначный вывод о степени участия мономерной молекулы B_A в качестве акцептора электрона

от P^* и о роли двухступенчатого процесса в первичном разделении зарядов в этих РЦ.

В данной работе методом сайт-направленной химической модификации были получены РЦ *Cfl. aurantiacus*, в которых селективное замещение БФео на растительный феофитин а (Фео) в сайте связывания H_A приводит к значительной модификации потенциала восстановления акцептора электронов в этом сайте и энергетики переноса электрона. Сравнительное исследование нативных и Фео_A-модифицированных РЦ *Cfl. aurantiacus* методом фемтосекундной абсорбционной дифференциальной спектроскопии при 100 К с последующим глобальным анализом 3D-массивов данных показало присутствие двух популяций возбужденного состояния первичного донора электрона P^* в соотношении 65%/35%. В одной популяции (~65%) P^* спадает примерно за 2 пс с образованием состояния с разделенными зарядами $P^+H_A^-$ через короткоживущий (~0.2 пс) промежуточный продукт $P^+B_A^-$ по двухступенчатому механизму $P^* \rightarrow P^+B_A^- \rightarrow P^+H_A^-$. В другой популяции (~35%) состояние $P^+H_A^-$ образуется за 20 пс путем прямого переноса электрона с P^* на H_A , вероятно, с виртуальным участием состояния $P^+B_A^-$ по механизму суперобмена. В обоих случаях первичное разделение зарядов осуществляется с квантовым выходом, близким к единице.

Работа выполнена за счёт средств госзадания № 122041100204-3.

**ФОТОГЕНЕРАЦИЯ И ТУШЕНИЕ СИНГЛЕТНОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО
КИСЛОРОДА БАКТЕРИАЛЬНЫМИ С40 КАРОТИНОИДАМИ**

**Photogeneration and quenching of singlet molecular oxygen by bacterial
C40 carotenoids**

А.А. Красновский^{1}, А.А. Ашихмин², А.С. Бендиткис¹, А.А. Москаленко²*

¹Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН Федерального
исследовательского центра биотехнологии РАН,
119071, Москва, Россия

²Пушкинский научный центр биологических исследований РАН,
Институт фундаментальных проблем биологии РАН,
142290, Пушкино, Россия

**e-mail: phoal@mail.ru*

Измерение фотосенсибилизированной люминесценции синглетного кислорода применено к изучению генерации и тушения синглетного кислорода С40 каротиноидами бактерий с использованием гексафторбензола в качестве растворителя. Впервые показано, что фитоин, фитофлуин, ζ-каротин, нейроспорин, ликопин и родопин способны к генерации синглетного кислорода в аэрированных растворах при фотовозбуждении в спектральной области их основных максимумов поглощения. Измерены квантовые выходы этого процесса и константы скорости тушения синглетного кислорода этими соединениями. Квантовые выходы варьируют от 0,4 (фитофлуин) до $(3-4,5) \times 10^{-4}$ – у нейроспорина, родопина и ликопина. Константы скорости тушения изменяются от 4×10^6 (фитоин) до примерно $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ у каротиноидов с числом сопряженных двойных связей 9-13. Насколько нам известно, константы скорости тушения синглетного кислорода фитоином, фитфлуином, ζ-каротином родопином и спириллоксантином также получены в нашей работе впервые. Обсуждаются роль этих процессов в комплексах LH2 фотосинтезирующих клеток. Подробное описание экспериментов приведено в работах:

Ashikhmin AA, Benditkis AS, Moskalenko AA, Krasnovsky AA Jr. (2020) Phytofluene as a Highly Efficient UVA Photosensitizer of Singlet Oxygen Generation. *Biochem* 85:773–780. <https://doi.org/10.1134/S0006297922007005>
Ashikhmin AA, Benditkis AS, Moskalenko AA, Krasnovsky AA Jr. (2022) ζ-Carotene: Generation and Quenching of Singlet Oxygen. Comparison with Phytofluene. *Biochem* 87:1169–1178. <https://doi.org/10.1134/S0006297922100108>
Benditkis AS, Ashikhmin AA, Moskalenko AA, Krasnovsky AA Jr. *Photosynthesis Res.*, submitted

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 23-65-10005.

**ГЕНЕРАЦИЯ ФОТОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СИГНАЛОВ В ХРОМАТОЗОМАХ
ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ ПРИ СТАЦИОНАРНОМ
ОСВЕЩЕНИИ *IN VITRO***

М.Д. Мамедов^{1*}, Л.А. Витухновская^{1,2}, А.А. Засна¹, А.Ю. Семенов^{1,2}

¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия

²Федеральный исследовательский центр химической физики
им. Н.Н. Семенова РАН, 119991 Москва, Россия

*e-mail: mahirmamedov@yandex.ru

Измерение разности электрических потенциалов (ΔV), генерируемой хромозомами из пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides*, погруженными внутрь мезопористого нитроцеллюлозного мембранного фильтра (МФ), зажатого между полупроводниковыми ИТО электродами в присутствии экзогенных медиаторов (пара аскорбат/N,N,N'-тетраметил-п-фенилендиамин и убихинон-0) продемонстрировало увеличение амплитуды, а также стабилизацию сигналов при стационарном освещении в присутствии дисахарида трегалозы. Показано, что хромозофы, в этой системе способны генерировать ΔV при стационарном освещении в течение более 1 ч и сохранять функциональную активность в течение месяца при хранении в темноте при комнатной температуре. В то же время при измерении светозависимой ΔV в хромозофах, ассоциированных с МФ, пропитанным раствором фосфолипидов, с помощью прямого электрометрического метода, в присутствии трегалозы наблюдается почти двукратное увеличение амплитуды, однако стабилизация при длительном освещении значительно менее выражена. Выявление стабильных ответов в системе ИТО-МФ-ИТО, вероятно, связано с сохранением интактной структуры белков хромозофов в липидном окружении внутри поры МФ. Стабилизирующее действие биопротектора трегалозы может быть обусловлено его влиянием как на фотосинтетическую электрон-транспортную цепь, так и на фосфолипидную мембрану хромозофов. Полученные результаты позволяют расширить современные представления об использовании полусинтетических структур на основе интактных фотосинтетических систем, способных преобразовывать солнечную энергию в электрохимическую форму.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (РНФ) 23-74-00025.

**ЭКСИТОННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТЕТРАМЕРА ХЛОРОФИЛЛА А В
ВОДОРАСТВОРИМОМ ХЛОРОФИЛЛ-СВЯЗЫВАЮЩЕМ БЕЛКЕ BoWSCP**

**Exciton interactions of chlorophyll *a* tetramer in the water-soluble chlorophyll-
binding protein BoWSCP**

Д.А. Черепанов^{1,2}, Г.Е. Милановский², К.В. Неверов^{3,4}, Ю.Н. Обухов³,
Ю.В. Малеева⁴, А.В. Айбуш¹, М.С. Крицкий³, В.А. Надточенко¹*

¹ФИЦ ХФ РАН, Москва

²НИИ ФХБ МГУ, Москва,

³Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Биотехнологии» РАН, Москва

⁴Биологический факультет МГУ, Москва

**e-mail: tscherepanov@gmail.com, тел. +7 495 9393188*

Проведен анализ экситонного взаимодействия четырех молекул хлорофилла *a* (Хл *a*) в симметричном тетрамерном комплексе водорастворимого хлорофилл-связывающего белка BoWSCP [1]. С помощью совместного разложения спектров поглощения и кругового дихроизма на гауссовские компоненты определена энергия экситонного расщепления $\Delta E = 227 \text{ см}^{-1}$ двух основных переходов тетрамера Хл *a* в BoWSCP; их относительные интенсивности составили 79% и 21%. Параметры экситонного взаимодействия были рассчитаны на основе атомной структуры BoWSCP в трех различных приближениях: (1) модель точечных диполей, (2) модель распределенных атомных монополей TrESP [2], и (3) нестационарная теория функционала плотности TDDFT/PCM [3]. Кулоновские взаимодействия мономеров в тетрамере BoWSCP были рассчитаны в континуальном приближении с использованием трех значений оптической диэлектрической проницаемости. Модели (1) и (2), основанные на описании свойств свободного мономера Хл *a* в растворе, демонстрирует существенную ошибку как в оценке абсолютной величины экситонного взаимодействия, так и в относительной интенсивности экситонных переходов. Сравнение результатов этих расчетов с экспериментально определяемыми параметрами позволило проанализировать точность используемых приближений и оценить вклад близкодействующих неэлектростатических взаимодействий в экситонное расщепление, определить ориентацию и абсолютную величину дипольного момента $S_0 \rightarrow S_1$ перехода мономера μ , а также определить относительный вклад состояний с разделенными зарядами (СТ-состояния) в волновую функцию возбужденного димера Хл *a* и дипольный момент перехода в СТ-состояния. Среди этих факторов наиболее существенное

значение имеют реактивное взаимодействие возбужденного пигмента с белковым окружением и деформация порфиринового макроцикла, приводящие совместно к увеличению дипольного момента перехода χ_{la} до значения 6.9 Д и к развороту вектора дипольного момента на 15° в сторону второго пиррольного кольца. Экспериментально наблюдаемой величине экситонного расщепления соответствует локальный индекс рефракции белка 1.4.

Работа выполнена при поддержке фонда РФФ (грант № 23-74-00025).

1. Y.V. Maleeva, K.V. Neverov, Y.N. Obukhov, M.S. Kritsky, Mol. Biol. (Mosk.), 53 (2019) 998–1011.
2. M.E. Madjet, A. Abdurahman, T. Renger, J. Phys. Chem. B, 110 (2006) 17268–17281.
3. D.A. Cherepanov, G.E. Milanovsky, A.V. Aybush, V.A. Nadtochenko, Russ. J. Phys. Chem. B, 42 (2023) 77-87.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИНЕТИКИ СВЕТОВОГО/ТЕПЛОВОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ
ФОТОСИСТЕМЫ II С ПОМОЩЬЮ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ИНТЕРФЕРОМЕТРИИ
ФИКСИРОВАННОЙ ДЛИНЫ**

**Determination of the kinetics of light-/heat-induced damage of photosystem II with
fixed-length ultrasonic interferometry**

Марк О. Пашин¹, Денис В. Яныкин^{1,2},
Максим Е. Асташев^{1,3}, Дмитрий А. Серов^{1,3}*

¹Институт общей физики РАН, Вавилова, д. 38, 119991 Москва, Россия

²Институт фундаментальных проблем биологии ФИЦ ПНЦБИ РАН,
Россия, 142290, г. Пущино, ул. Институтская, д. 2, г. Пущино

³Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, Россия,
142290, г. Пущино, ул. Институтская, д. 3

**e-mail: pashin.mark@mail.ru, тел. +7 930 1195018*

Известно, что фотосистема II (ФСII) растений очень чувствительна к воздействию неблагоприятных факторов среды, таких как температура, избыточное освещение и т.д., которые приводят к изменению состояний и точек фазовых переходов компонентов ФСII. Чувствительность ФСII к фотоингибированию значительно усиливается в присутствии молекулярного кислорода, с которым связывают образование АФК и перекисное окисление органических компонентов фотосистемы, таких как белки и липиды. Повышенная или пониженная температура может приводить к потере функциональной активности пигмент-белкового комплекса. Например, внешние белки водоокисляющего комплекса (в растениях представлены белками PsbO, PsbP и PsbQ), прочно связаны с реакционным центром ФСII и в результате действия таких факторов может происходить их диссоциация из ФСII. В настоящее время основными подходами для изучения состояния и фазовых переходов являются дифференциально-сканирующая калориметрия, ЯМР-спектроскопия, Фурье-инфракрасная спектроскопия и др. Большинство из этих подходов требуют дорогостоящего оборудования и расходных материалов. В данной работе предложен альтернативный подход, предполагающий использование недорогого ультразвукового спектрометра собственной разработки. С использованием простых модельных образцов (легкая, тяжёлая вода, липосомы) подтверждены высокие точность и чувствительность ультразвукового спектрометра во всех диапазонах

температур. С помощью ультразвукового спектрометра фиксированной длины были продемонстрированы фото- и теплоиндуцированные (при 35,5, 43,5, 56,5 и 66,7 °С) изменения состояния «ядерных» комплексов ФСII, которые могут отражать разборку комплексов и денатурацию белков. Таким образом, наше исследование демонстрирует возможность применения ультразвукового спектрометра фиксированной длины для определения кинетики теплового и фотоиндуцированного повреждения биологических мембран и белковых комплексов.

Работа была поддержана Российским научным фондом (грант № 22-24-01179).

ФОТОСИНТЕЗ НА ДАЛЬНЕМ КРАСНОМ СВЕТУ: РАЗДЕЛЕНИЕ ЗАРЯДОВ И ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНА В УНИКАЛЬНОЙ ФОТОСИСТЕМЕ I ИЗ ЦИАНОБАКТЕРИИ *ACARYOCHLORIS MARINA*

Photosynthesis under far red light: charge separation and electron transfer in the peculiar photosystem I complex of cyanobacterium *Acaryochloris marina*

Анастасия Петрова^{1*}, *Иван Шелаев*², *Федор Гостев*²,
*Арсений Айбуи*², *Андрей Засна*¹, *Георгий Милановский*¹,
*Anna Paola Casazza*³, *Stefano Santabarbara*³,
*Алексей Семенов*¹, *Дмитрий Черепанов*^{1,2}

¹НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ,
Москва, Россия

²Федеральный исследовательский центр химической физики имени
Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия

³Photosynthesis Research Unit, National Research Council of Italy,
Milan, Italy

*e-mail: draparnaldia@gmail.com, тел. +7 915 2967973

Своеобразный пигментный состав фотосинтетического аппарата цианобактерии *Acaryochloris marina* привлекает исследователей с момента открытия этого вида в 1996 году [1]. В отличие от большинства известных фотосинтезирующих организмов преобладающим пигментом в фотосистеме I (ФС1) *A. marina* является хлорофилл *d* (*Chl d*). Спектр поглощения *Chl d* сдвинут относительно хлорофилла *a* (*Chl a*) в длинноволновую область почти на 30 нм. Это позволяет *A. marina* использовать для фотосинтеза дальний красный свет. Исследование фотохимического преобразования энергии в реакционных центрах (РЦ) ФС1 из *A. marina* показало, что здесь в роли специальной пары выступает димер молекул *Chl d* с максимумом поглощения при 740 нм (P₇₄₀) [2]. Это ведет к снижению энергии возбужденного состояния на ~0.09 эВ, а значит, ожидается уменьшение движущей силы реакций разделения и стабилизации зарядов по сравнению с классической ФС1. Исследование структуры ФС1 из *A. marina* [3] показало, что вместо молекул *Chl a* в сайтах eC2 присутствуют молекулы *Chl d*, а в сайтах eC3 молекулы феофитина *a* (*Pheo a*). Столь необычная для ФС1 структура должна, по всей видимости, компенсировать потерю энергии, но точные кинетические и термодинамические характеристики первичных реакций не определены. Особенности структуры ФС1 из *A. marina* определяют возможность спектроскопического исследования этих реакций: полоса Q_Y в спектре

Pheo a имеет максимум около 680 нм, а электронные переходы *Chl d* антенны и РЦ происходят в диапазоне 700–740 нм. Таким образом, в спектре ФС1 из *A. marina* присутствует спектральная метка, по времени появления которой можно судить о кинетике фотохимических реакций.

Методом абсорбционной спектроскопии возбуждение-зондирование на выделенных комплексах ФС1 из *A. marina* мы исследовали индуцированные лазерной вспышкой (630 и 740 нм) спектральные изменения в диапазоне 400–800 нм на временах 0,1 – 500 пс [4]. В полученных спектрально-временных матрицах четко проявились полосы поглощения P_{740}^+ (470 нм) и выцветания $Pheo_{a3}^-$ (682 нм). Математический анализ кинетики этих полос позволил достоверно установить, что первичная ион-радикальная пара в ФС1 из *A. marina* – это $P_{740}^+Chl_{d2}^-$, которая находится в быстром равновесии со следующей, стабильной, парой $P_{740}^+Pheo_{a3}^-$. Константы равновесия этих реакций составляют 3.7 и 3.1, соответственно. Таким образом, свободная энергия образования стабильной пары $P_{740}^+Pheo_{a3}^-$ составляет всего 63 мВ.

1. Miyashita et al., Nature 383, 402 (1996)
2. Hu et al., PNAS 95, 13319–13323 (2017)
3. Hamaguchi et al., Nat. Commun. 12, 1 – 10 (2021)
5. Petrova et al., BBA – Bioenerg. 1864, 148984 (2023)

Работа выполнена при поддержке фонда РФФ (грант № 21-74-10085).

**РОЛЬ ДЛИННОВОЛНОВЫХ ФОРМ ХЛОРОФИЛЛА В ПЕРЕНОСЕ ЭНЕРГИИ И
РАЗДЕЛЕНИИ ЗАРЯДОВ В ПИГМЕНТ-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСАХ
ФОТОСИСТЕМ 1 И 2 ЦИАНОБАКТЕРИЙ**

**The role of the long-wavelength forms of chlorophyll in energy transfer and
charge separation in pigment-protein complexes of photosystems I and II of
cyanobacteria**

А.Ю. Семенов^{1,2}, И.В. Шелаев¹, Ф.Е. Гостев¹, В.А. Надточенко¹,
Дж. Гольбек³, Д.А. Черепанов^{1,2}*

¹ФИЦ «Химическая физика» им. Н.Н. Семенова РАН, Косыгина 4,
117977, Москва

²НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские
горы 1, стр.40 119992, Москва

³The Pennsylvania State University, University Park, 16802,
Pennsylvania, USA

*e-mail: semenov@belozersky.msu.ru, тел. +7 495 9393188

Некоторые виды цианобактерий при выращивании в условиях освещения в дальней красной области (700–800 нм) синтезируют модифицированные белковые комплексы фотосистем (ФС) 1 и 2. В структуре комплекса ФС1 из *Fischerella thermalis* PCC 7521, помимо молекул хлорофилла (Хл) *a*, было обнаружено 7 молекул длинноволнового Хл *f* [1], а в структуре ФС2 из *Synechococcus* sp. PCC 7335 – 4 молекулы Хл *f* и одна молекула Хл *d* [2].

Сверхбыстрая кинетика абсорбционных изменений в ФС1 и ФС2 регистрировалась с помощью фемтосекундной лазерной спектроскопии методом «возбуждение – зондирование» во временном диапазоне 100 фс – 500 пс и спектральном диапазоне 400 – 800 нм. Анализ кинетики абсорбционных изменений в ФС1 из *F. thermalis* показал, что все молекулы Хл *f* локализованы в светособирающей антенне (ССА) и функционируют в качестве длинноволновых ловушек для квантов света ≥ 720 нм. Молекулы Хл *f* в ССА формируют два основных пула, первый из которых имеет максимум поглощения при 740 нм, а второй – представляет собой экситонно-сопряженный гомо- или гетеродимер молекул Хл с максимумом поглощения при 790 нм. Длинноволновые формы Хл *f* передают энергию возбуждения на молекулы Хл *a* реакционного центра (РЦ) с характерным временем ~ 250 пс, что значительно превышает характерное время переноса электрона на филлохиноновый акцептор A_1 (~ 25 пс) [3].

Исследование кинетики первичных реакций в ядерных комплексах ФС2 из *Synechococcus* 7335, выращенных на дальнем красном свете, показало, что молекулы Хл *f*, как и в случае ФС1, передают энергию длинноволнового возбуждения из ССА в РЦ с характерным временем ~300 пс. При непосредственном возбуждении РЦ импульсом 710 нм первичным донором электрона является димер Хл *a* (P₆₈₀), а первичным акцептором – Хл *d*, локализованный в сайте ChlD₁. Вторичным акцептором является феофитин PheoD₁, который восстанавливается с характерным временем ~20 пс.

Работа выполнена при поддержке фонда РФФ (грант № 23-74-00025).

1. C. Gisriel et al., SCIENCE ADVANCES, 2020, Vol 6, DOI: 10.1126/sciadv.aay6415
2. C. Gisriel et al., J. Biol. Chem., 2022, 298, 101424.
3. D. Cherepanov et al., BBA – Bioenergetics, 2020, 1861, 148184.

**ПРИМЕНЕНИЕ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ
ВЛИЯНИЯ ПОВЕРХНОСТНО АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
НА МОДЕЛЬНЫЕ МЕМБРАНЫ**

**Ultrasonic spectrometry application to assess the effect of surfactants
on model membranes**

*Дмитрий Серов**, Максим Асташев, Марк Пасхин, Денис Яныкин

Институт общей физики им. А.М. Прохорова, Москва, Россия

*e-mail: dmitriy_serov_1@mail.ru, тел. +7 985 3190321

Фазовое состояние мембраны тилакоида может значительно влиять на функциональное состояние белков фотосистемы II [1]. В частности, исследование точек фазовых переходов мембраны может применяться для оценки фотоингибирования фотосистемы II. Основными подходами для изучения состояния и фазовых переходов являются дифференциальная сканирующая калориметрия, ЯМР-спектроскопия и др. [2]. Данные методы требуют дорогостоящего оборудования и расходных материалов. Ультразвуковая спектрометрия является недорогой альтернативой указанных методов [3]. В настоящей работе была оценена возможность применения ультразвуковой спектрометрии для детекции эффектов модификаторов свойств липидных мембран: додецилсульфата натрия (SDS) и пальмитиновой кислоты (ПА) на фазовое состояние модельных липосом, изготовленных из димиристоилфосфатидилхолина (DMPC). Измерения выполняли на улучшенной установке для ультразвуковой спектрометрии, разработанной нами [4] Липосомы готовили путем 11-кратной экструзии DMPC через мембрану 200 нм при 25°C после пяти циклов замораживания и оттаивания. Измерения выполняли в диапазоне температур 14-36 °C в присутствии 50 мМ KCl, 20 мкМ EGTA, 10 мМ Tris-HCl (pH 8,5) и 1% этанола (вносимый с ПА). Для каждого варианта эксперимента было выполнено по три измерения. Точка фазового перехода DMPC без добавок составляла 23,85 °C. Добавка 20 мкМ SDS снижала точку фазового перехода до 23,25°C за счёт дестабилизации мембраны. На фоне комбинации 20 мкМ SDS и 20 мкМ ПА обнаружены две точки фазового перехода 26,10 и 28,90 °C, что указывает на нарушение кооперативности фазового перехода. Добавка 200 мМ Ca²⁺ отменяла эффекты комбинации SDS/ПА путём связывания остатков жирных кислот. Таким образом, показана применимость ультразвуковой спектрометрии для детекции эффектов модификаторов свойств мембран. В дальнейшем,

метод может применяться для оценки функционального состояния фотосинтетических мембран.

Работа была поддержана фондом РФФ (грант № 22-24-01179). The work was supported by the Russian Science Foundation Grant No. 22-24-01179, <https://rscf.ru/project/22-24-01179/> (accessed on 19 May 2023).

1. Loll, B.; Kern, J.; Saenger, W.; Zouni, A.; Biesiadka, J. Lipids in photosystem II: Interactions with protein and cofactors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2007, 1767, 509-519.
2. Krivanek, R.; Dau, H.; Haumann, M. Enthalpy Changes during Photosynthetic Water Oxidation Tracked by Time-Resolved Calorimetry Using a Photothermal Beam Deflection Technique. *Biophysical Journal* 2008, 94, 1890-1903.
3. Sarvazyan, A.P.; Kharakoz, D.P. Small Volume Differential Interferometer for Velocity and Absorption Measurements of Ultrasound. *Prib. Tekhn. Eksper.* 1981, 203-206.
4. Yanykin, D.V.; Astashev, M.E.; Khorobrykh, A.A.; Paskhin, M.O.; Serov, D.A.; Gudkov, S.V. Application of Fixed-Length Ultrasonic Interferometry to Determine the Kinetics of Light-/Heat-Induced Damage to Biological Membranes and Protein Complexes. *Inventions* 2022, 7, 87.

**ФЕМТОСЕКУНДНАЯ РЕЛАКСАЦИОННАЯ ДИНАМИКА ВОЗБУЖДЕННЫХ
СОСТОЯНИЙ ХЛОРОФИЛЛОВ А, В И D В ПИГМЕНТ-БЕЛКОВЫХ
КОМПЛЕКСАХ И РАСТВОРАХ**

**Femtosecond relaxation dynamics of excited states of chlorophylls *a*, *b*, and *d* in
pigment-protein complexes and solutions**

Д.А. Черепанов^{1,2}, Ю.Н. Обухов³, А.А. Петрова², Г.Е. Милановский²,
К.В. Неверов^{3,4}, Ю.В. Малеева⁴, А.В. Айбуш¹,
М.С. Крицкий³, В.А. Надточенко¹*

¹ФИЦ ХФ РАН, Москва

²НИИ ФХБ МГУ, Москва,

³Институт биохимии им. А. Н. Баха, ФИЦ «Биотехнологии» РАН, Москва

⁴Биологический факультет МГУ, Москва

*e-mail: tscherepanov@gmail.com, тел. +7 495 9393188

Методом широкополосной фемтосекундной лазерной спектроскопии «возбуждение-зондирование» измерена абсорбционная динамика хлорофиллов (Хл) *a*, *b* и *d* в тетрагидрофуране и в рекомбинантных водорастворимых хлорофилл-связывающих белках ВоWSCP и LvWSCP в диапазоне от 400 до 800 нм. Абсорбционная динамика была индуцирована в области 430, 630 и 670 нм. Получены спектры поглощения возбужденных синглетных состояний S_1 хлорофиллов *a* и *d*, а также определена динамика сдвига полосы Q_y стимулированного излучения этих пигментов (Стоксов сдвиг полосы флуоресценции) во временном диапазоне от 60 фс до 4 пс в растворе. Измерена кинетика внутримолекулярной конверсии $Q_x \rightarrow Q_y$ (электронный переход $S_2 \rightarrow S_1$); характерное время релаксации составило 54 ± 3 фс для хлорофилла *a* и 45 ± 9 фс для хлорофилла *d*.

В пигмент-белковых комплексах ВоWSCP и LvWSCP определена динамика релаксации возбужденных экситонных состояний тетрамера Хл *a* в области полосы Q_y , кинетика переноса возбуждения от Хл *b* к Хл *a*, а также Стоксов сдвиг стимулированного излучения этих пигментов во временном диапазоне от 60 фс до 500 пс. Определен механизм электронных переходов в тетрамере WSCP. Фононная релаксация в пределах одного электронного состояния сопровождается Стоксовым сдвигом полосы вынужденного излучения, не меняя его амплитуды. Электронный переход $E_1 \rightarrow E_2$ в тетрамере WSCP сопровождается

существенным уменьшением суммарной амплитуды полосы выцветания полосы Q_y в переходных спектрах. Изменение длины волны возбуждающего импульса позволяет варьировать вклад вибронных мод в электронном состоянии S_1 . Анализ абсорбционной динамики при возбуждении Хл a в области Core на 430 нм позволил определить энергию реорганизации фононной подсистемы. Фононная релаксация, наблюдаемая как сдвиг Стокса полосы стимулированного излучения $S_1 \rightarrow S_0$, происходит на временах $\tau_{Stokes} \leq 60$ фс, электронная релаксация $E_1 \rightarrow E_2$ происходит со временем $\tau_{12} = 120$ фс.

Работа выполнена при поддержке фонда РФФ (грант № 22-24-00705).

ВЛИЯНИЕ ЗАСУХИ НА РАБОТУ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ПЛЕНЧАТОГО ОВСА

Светлана Чуракова

ФГБНУ ФАНЦ Северо-Востока

**e-mail: sveta.1917@mail.ru, тел. +7 922 9655517*

Овес – растение умеренного климата. Он хорошо переносит заморозки, но чувствителен к засухе, особенно в период до выметывания [1]. Нами было проведено исследование влияния засухи на структурно-функциональные характеристики работы фотосинтетического аппарата пленчатого овса.

Объектом исследования являлись 5 сортов пленчатого овса Медведь, Сапсан, Кировский 2, Фаленец и Кречет. Образцы выращивались в течение 14 дней на полном питательном растворе (контроль) и в растворе ПЭГ при 7 атм. (опыт). Измерения проводились после темновой адаптации в течение 20 минут с использованием флуориметра Fluor Pen FP 110/S согласно руководству производителя по методу ОЛР-теста [2].

В результате исследования мы рассчитали нормализованные показатели уровня воздействия стресса на основные параметры ОЛР-теста для всех сортов. Начальная и максимальная флуоресценции (F_0 и F_m) сохраняла тенденцию к снижению показателей в условиях опыта во всех исследуемых сортах. Кречет превысил средний показатель, снизив значения флуоресценции до 10%. Показатели работы антенных комплексов и реакционных центров имели чуть большую вариабельность. Максимальный квантовый выход ФС2 (F_v/F_m) всех сортов имел почти нулевое отклонение и никак не изменялся под воздействием стресса. Величина способности антенных комплексов улавливать кванты света (F_v/F_0) в среднем не менялась, снижая показатели на 10%, за исключением сорта Кречет, который сохранил уровень способности улавливать кванты. Эффективность электронного транспорта от Q_A к Q_B (ψ_0) при тенденции сохранения значений в условиях стресса выросла у сорта Кречет на 31,6% и снизилась у Медведя на 14,9%. Сорта Кировский 2 и Кречет снизили значения эффективности электронного транспорта от Q_B до первичного акцептора ФС1 (δ_{RE}) на 19,61% и 10,75% соответственно, а Медведь и Сапсан улучшили показатели на 44,22% и 25,18%. Суммарная эффективность электронного транспорта от ФС2 до ФС1 (ψ_{RE}) в опытном варианте имела положительную тенденцию у всех сортов овса (от 9,90% до 30,51%), кроме Кировский 2, потерявшего 12,13%.

В категории специфических потоков энергии в перерасчете на один реакционный центр ФС2 параметры ABS/RC (поток адсорбированной световой энергии) и TR_o/RC (максимальный поток захваченных экситонов) значительно не отличались от средних показателей группы, в наименьшей степени реагируя на стресс. Наибольшую амплитуду значений показал поток электронного транспорта от Q_A до Q_B (ET_o/RC), где Кировский 2 потерял почти 50%, а Сапсан в 2,5 раза вырастил уровень потока. Потери энергии при диссипации (DI_o/RC) сократил только сорт Кречет, на 4,31%, в остальных случаях потери энергии увеличивались.

Перфоманс-индексы сохранения энергии от адсорбированного фотона до редукции Q_B (PI_{ABS}) или до акцептора ФС1 (PI_{ABS_total}) дают оценку общей продуктивности ФС2. Сорт Кречет значительно улучшил показатели сохранения энергии на 49,49-76,96%. Сапсан также вырастил оба показателя в пределах 11,04-52,30%. Фаленец потерял в значениях 35-36% обоих перфоманс-индексов.

По усредненным данным измеряемые показатели разделились на отрицательно (F₀, F_m, PI_{ABS_total}, PI_{ABS}, F_v/F_m и F_v/F_o) и положительно реагирующие на стресс (ψ_o, δ_{RE}, ψ_{RE}, ABS/RC, TR_o/RC, ET_o/RC и DI_o/RC). Потери значений варьировались от 1,67% до 34,56%, прирост составлял 1,00-9,90%. Самыми чувствительными из измеряемых параметров к условиям стресса показали себя F₀, F_m и PI_{ABS}. Можно выделить сорта Кречет и Сапсан, значительно превысившие средние результаты группы. Фаленец оказался наименее устойчивым к осмотическому стрессу при оценке общей продуктивности ФС2, несмотря на то что его остальные функциональные характеристики страдали в меньшей степени.

1. Тоноян С.В., Киселев Е.Ф., Афанасьева В.К., Зяблова М.Н., Богданов А.Ю., Бунеев М.П. Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. 2012. № 4. С. 41-48.
2. Лисицын Е.М., Чуракова С.А., Баталова Г.А. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2022. Т. 183. № 3. С. 17-26.

**ФЕМТОСЕКУНДНАЯ ЭКСИТОННАЯ РЕЛАКСАЦИЯ В ХЛОРОСОМАХ
ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ ЗЕЛЕННОЙ БАКТЕРИИ
*CHLOROFLEXUS AURANTIACUS***

**Femtosecond exciton relaxation in chlorosomes of a photosynthetic green
bacterium *Chloroflexus aurantiacus***

Андрей Яковлев, Александра Таисова, Зоя Фетисова*

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского
МГУ имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

**e-mail: taisova@belozersky.msu.ru*

В зеленых бактериях *Chloroflexus (Cfx.) aurantiacus* процесс фотосинтеза начинается с поглощения света хлоросомами – периферическими антеннами, состоящими из тысяч молекул бактериохлорофилла *c* (БХл *c*), объединенных в олигомерные структуры. При этом в БХл *c* образуются возбужденные состояния, энергия которых мигрирует по хлоросоме по направлению к базовой пластинке и далее к реакционному центру, где происходит первичное разделение зарядов. Миграция энергии сопровождается безызлучательными электронными переходами между многочисленными экситонными состояниями, то есть экситонной релаксацией. В настоящей работе мы изучали динамику экситонной релаксации в хлоросомах *Cfx. aurantiacus* с помощью разностной фемтосекундной спектроскопии при криогенной температуре (80 К). Хлоросомы возбуждались световыми импульсами длительностью 20 фс на длинах волн в диапазоне от 660 до 750 нм, а разностные (свет – темнота) кинетики поглощения измерялись на длине волны 755 нм. Математический анализ полученных данных выявил кинетические компоненты с характерными временами 140, 220 и 320 фс, отвечающие за экситонную релаксацию. По мере уменьшения длины волны возбуждения количество и относительный вклад этих компонент увеличивались. Теоретическое моделирование полученных данных было проведено на основе представлений о цилиндрическом строении агрегатов БХл *c* [1]. Безызлучательные переходы между группами экситонных полос описывались системой кинетических уравнений. Наиболее адекватной оказалась модель, учитывающая энергетический и структурный беспорядок хлоросом.

1. Fetisova, Z.G., Freiberg, A.M., Mairing, K., Novoderezhkin, V.I., Taisova, A.S., Timpmann, K.E. (1996) Excitation energy transfer in chlorosomes of green bacteria: Theoretical and experimental studies, *Biophys. J.*, **71**, 995–1010.

Секция 2. РЕГУЛЯЦИЯ ФОТОСИНТЕЗА

АНАЛИЗ ЛИМИТИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ ФИКСАЦИИ CO₂ В ЛИСТЬЯХ ЯЧМЕНЯ, ВЫРАЩЕННЫХ НА СВЕТУ РАЗЛИЧНОГО СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА

Factors limiting CO₂ fixation in leaves of barley under light of different spectra

Александра Анисина, Ольга Аверчева, Елизавета Бассарская,
Галина Кочетова, Татьяна Жигалова*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Биологический факультет, кафедра физиологии растений, Москва, Россия

**e-mail: Deoxyribose01@yandex.ru, тел. +7 910 1467866*

Предмет изучения в нашей работе – влияние света различного спектрального состава на факторы, ограничивающие ассимиляцию CO₂ растениями, такие как активность Рубиско, скорость регенерации рибулозо-бисфосфата и отток продуктов фотосинтеза. Исследования проводили на 9-дневных проростках ячменя *Hordeum vulgare* L. сорта «Луч», выращенных при освещении светодиодными светильниками, излучающими узкополосный красный (КС) и синий (СС) свет ($\lambda_{\max} = 655$ нм, $\Delta \lambda_{1/2} = 16$ нм и $\lambda_{\max} = 451$ нм, $\Delta \lambda_{1/2} = 23$ нм соответственно). В качестве контрольной группы использовали проростки, выросшие под белыми люминесцентными лампами (БС). Интенсивность освещения (70 мкмоль*м⁻²*с⁻¹), фотопериод (16/8) и другие условия выращивания для всех трех групп были идентичны.

В работе использовали инфракрасный газоанализатор в составе CIRAS-3 (PP Systems, США) для детектирования изменений концентраций CO₂ и водяного пара в кювете с листом при подаче туда разного количества CO₂. После чего для каждой точки были рассчитаны такие параметры газообмена, как уровень ассимиляции CO₂ и его концентрация в подустьичном пространстве. Зависимость первой величины от второй (концентрационная кривая ассимиляции CO₂) была аппроксимирована уравнениями модели Farquhar-von Caemmerer [1]. Исходя из этого для каждой кривой были рассчитаны следующие параметры: максимальная активность рибулозобисфосфат-карбоксилазы/оксигеназы, максимально возможный уровень электронного транспорта, темновое дыхание,

скорость использования триозофосфатов и концентрация CO_2 в подустьичном пространстве, при которой один ограничивающий фактор сменяется на другой.

Мы установили, что КС-растения характеризуются пониженной активностью Рубиско, близким к нулю уровнем темнового дыхания. У таких растений переход от лимитирования ассимиляции работой Рубиско к ее ограничению скоростью восполнения пула рибулозо-бисфосфата происходит при более высокой концентрации CO_2 в подустьичном пространстве. СС-растения не имеют значимых отличий от контрольных по этим параметрам. Скорость электронного транспорта различается у всех трех групп растений. У СС-растений она наибольшая, у КС-растений – наименьшая. КС-растения характеризуются наименьшей скоростью использования триозофосфатов, что соотносится с их ослабленным дыханием, тогда как использование ассимилятов у СС-растений – наибольшее, что объясняет повышенную скорость поглощения CO_2 этой группой растений при высоких концентрациях этого газа в воздухе. При содержании углекислого газа, близком к атмосферному, у БС и СС-растений поглощение CO_2 ограничивается электронным транспортом, тогда как у КС-растений – активностью Рубиско. Полученные результаты показали, что синий свет более благоприятен, чем красный, для формирования компонентов не только световой, но и темновой стадии фотосинтеза проростков ячменя.

1. Caemmerer S. von, Farquhar G.D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves // *Planta*. 1981. V. 153. No. 4. – P. 376–387.

РОЛЬ КАРОТИНОИДОВ И ФЛАВОНОИДОВ В АДАПТАЦИИ МУТАНТНЫХ РАСТЕНИЙ *SOLANUM LYCOPERSICUM* С ВЫСОКИМ И НИЗКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ПИГМЕНТОВ К СВЕТУ ВЫСОКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ

The role of carotenoids and flavonoids in the adaptation of *Solanum lycopersicum* mutant plants with high and low pigment content to high intensity light

Александр Ашихмин^{1*}, *Максим Большаков*¹, *Александра Худякова*¹,
*Владимир Креславский*¹, *Павел Паиковский*^{1,2},
Михаил Верещагин^{1,2}, *Анатолий Кособрыхов*¹

¹Институт фундаментальных проблем биологии РАН - обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН,
142290, г. Пущино, Московская обл., Россия

²Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276,
Москва, Россия

*e-mail: ashikhminaa@gmail.com, тел. +7 496 7731849

В растениях при действии света высокой интенсивности (СВИ), когда избыточно поглощенная световая энергия не может быть использована в фотохимических реакциях, происходит фотоингибирование, сопровождающееся снижением интенсивности фотосинтеза и накоплением активных форм кислорода (АФК). Значительную роль в нейтрализации АФК играют ферментативные антиоксиданты и низкомолекулярные антиоксиданты, вторичные метаболиты – каротиноиды и антоцианы. Имеющиеся мутанты растений *Solanum (S.) lycopersicum*, различающиеся по содержанию антоцианов и каротиноидов, являются удобной модельной системой, позволяющей оценить роль этих пигментов в процессах адаптации фотосинтетического аппарата к СВИ.

Целью данного исследования являлось изучение при действии СВИ особенностей адаптации растений *S. lycopersicum* мутантов *hp* 3005 и *lp* 3617 (повышенное и пониженное содержание пигментов, соответственно) по сравнению с диким типом (ДТ). Семена мутантов томатов были получены из Tomato Genetics Resource Center (США, Калифорния). В ходе эксперимента растения облучали непрерывно СВИ в течение 24 и 72 ч с использованием белых светодиодов (интенсивность 1000 и 2000 ± 50 мкмоль (фотонов) м⁻² с⁻¹). Было установлено, что в исходной точке содержание хлорофиллов и каротиноидов у *hp* мутанта в 2 раза больше, чем у *lp*, и в 1,3 раза больше, чем у ДТ. При интенсивности света 1000 мкмоль м⁻² с⁻¹ через 24 ч у *lp* и ДТ наблюдалось повышение содержания

пигментов, при этом у *hp*, напротив, содержание хлорофиллов и каротиноидов снижалось. Через 72 часа при $1000 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ уровень всех пигментов снижался у мутантов и ДТ. При $2000 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ содержание пигментов через 24 ч не изменялось у ДТ, а у *hp* снижение было на 30% относительно исходной точки, напротив у *lp* наблюдался небольшой рост, а через 72 ч у *hp* 3005 мутанта было обнаружено максимальное содержание пигментов среди всех изученных вариантов – 3.0 мг/г сырой массы. При $1000 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ относительно исходного уровня у *hp* 3005 повышался процент неолутеина и зеаксантина, у *lp* 3617 - лутеина, а у ДТ - зеаксантина. При $2000 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ основной отличительной особенностью мутанта 3617 было увеличение неоксантина в первые 24 ч эксперимента, а также максимальный процент лутеина и зеаксантина через 72 ч облучения, а у *hp* 3005 – возрастание содержания β -каротина также через 72 ч облучения. При этих же условиях суммарная активность неферментативных антиоксидантов в экстрактах листьев у *hp* мутанта возрастала и превышала начальный уровень ДТ более чем в 7 раз. Наоборот, у *lp* и ДТ через 72 ч наблюдалось снижение активности неферментативных антиоксидантов. С использованием световой микроскопии изучены анатомические отличия листьев, которые указывают на то, что у *hp* мутанта под эпидермальным слоем образуются клетки с повышенным содержанием антоцианов, чего не наблюдалось у *lp* мутанта. Полученные данные демонстрируют ценность мутанта *hp* как источника антиоксидантов и могут быть использованы для разработки подходов для увеличения содержания биологически активных веществ в растениях томата.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-74-10086).

**ВЛИЯНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА ПРОТЕКАНИЕ ПРОЦЕССА STATE
TRANSITIONS У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ**

Effect of Hydrogen Peroxide on State Transitions in Higher Plants

*Н.В. Балашов**, *Д.В. Ветошкина*, *М.М. Борисова-Мубаракишина*

Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное
подразделение ФИЦ Пушинский научный центр биологических
исследований РАН

*e-mail: kbalashovv@mail.ru

Фотосинтезирующие организмы постоянно сталкиваются с меняющимися условиями среды, к которым им нужно адаптироваться. К одному из самых важных таких условий относится освещение, спектральный состав и интенсивность которого могут меняться очень быстро в течение дня. Одним из адаптационных ответов на изменение спектрального состава света является механизм state transitions, переходы состояний фотосинтетической антенны. С помощью этого механизма растения могут перераспределять световую энергию между двумя фотосистемами за счет обратимой миграции части светособирающей антенны фотосистемы 2 (ФС2). При облучении светом, преимущественно возбуждающим ФС2, происходит фосфорилирование белков Lhcb1 и Lhcb2 светособирающей антенны ФС2 с помощью фермента STN7 киназы, и миграция внешней части антенны к фотосистеме 1 (ФС1). Известно, что повышенная освещенность ингибирует работу киназы и накопление фосфорилированных белков Lhcb1 и Lhcb2, однако механизм ингибирования остается невыясненным. Известно, что повышенная освещенность приводит к накоплению активных форм кислорода внутри хлоропласта, в том числе пероксида водорода. Более того, часть продуцирующегося при высокой интенсивности света пероксида водорода образуется вблизи тилакоидной мембраны в непосредственной близости от STN7 киназы, позволяя выдвинуть гипотезу о регуляторной роли пероксида водорода в ингибировании активности STN7 киназы на высоком свете.

В нашей работе проведено исследование светозависимого накопления фосфорилированных белков Lhcb1-P и Lhcb2-P в присутствии и отсутствие пероксида водорода. Работа проводилась на интактных тилакоидных мембранах растения *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia-0.

Интактность тилакоидных мембран проверяли с помощью измерения скорости поглощения кислорода на свету. Содержание белков Lhcb1-P и Lhcb2-P оценивали с помощью вестерн блот анализа с применением специфичных антител. Светозависимое накопление белков Lhcb1-P и Lhcb2-P достоверно ингибировалось при добавке пероксида водорода при освещении тилакоидных мембран светом низкой интенсивности. При этом, действие пероксида водорода влияло специфично только на работу STN7 киназы, поскольку накопление продукта фосфорилирования другой киназы (STN8), фосфорилированного белка D1, не уменьшалось при добавке пероксида водорода.

Таким образом, полученные в нашей работе результаты свидетельствуют об ингибирующем действии пероксида водорода на активность STN7 киназы, раскрывая механизм ингибирования процесса state transitions в тилакоидах высших растений.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-74-10088.

**ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ПУЛА ПЛАСТОХИНОНА
ХЛОРОПЛАСТОВ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ В СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ**

**Changes in functioning of chloroplast plastoquinone pool in higher plants
under stress conditions**

Мария Борисова-Мубаракшина, Марина Козулева, Дарья Вильянен,
Александр Ашихмин, Илья Найдов, Екатерина Пыхова,
Дарья Ветошкина, Азат Абдуллатыпов, Борис Иванов*

Институт фундаментальных проблем биологии РАН Федерального
исследовательского центра «Пушкинский научный центр биологических
исследований Российской академии наук», ул. Институтская., д. 2,
г. Пушкино, Московская область, 142290, Россия

**e-mail: mubarakshinamm@gmail.com, тел: +7 496 7732715*

Пластохинон – мобильный липофильный переносчик электронов между ФС 2 и цитохромным b6/f комплексом – играет важную роль в регуляции фотосинтеза. Пул пластохинона вовлечен не только в линейный перенос электронов, но и в циклический транспорт электронов вокруг ФС 1, в реакцию Мелера, т.е. светозависимое восстановление кислорода до пероксида водорода (H_2O_2), а также в хлордыхание. Окислительно-восстановительный статус ПХ пула имеет важное значение для согласованного перераспределения энергии квантов света между фотосистемами (state transitions); регуляции экспрессии пластидных генов, и ретроградного пути сигнализации от хлоропласта к ядру. Однако механизмы таких функций пула пластохинона и влияние изменений функционирования пула на их протекание все еще не расшифрованы.

В стрессовых условиях повышается продукция АФК в хлоропластах, таких как супероксидный анион-радикал и H_2O_2 (Kozuleva et al., 2011; Borisova-Mubarakshina et al., 2012). Считается, что диспропорционирование супероксидных анион-радикалов, катализируемое супероксиддисмутазой (СОД) в строме хлоропластов – основной путь образования H_2O_2 в хлоропластах. Нами показано, что при повышенной освещенности существует другой, СОД-независимый путь образования H_2O_2 в тилакоидной мембране (Mubarakshina et al., 2006). Установлено, что образование такого мембранного H_2O_2 происходит в результате реакции супероксидных анион-радикалов с восстановленным пластохиноном, молекулой пластогидроксинона, ПХН₂ (Borisova-Mubarakshina et al., 2018). Протекание данной реакции способствует окислению пула пластохинона и нейтрализации супероксидного анион-

радикала в тилакоидных мембранах; при этом образовавшийся H_2O_2 может выполнять роль сигнальных агентов, характеризующих окислительно-восстановительное состояние пула пластохинона.

Кроме того, при сильном стрессовом воздействии происходит накопление окисленных производных пластохинона, т.н. молекул пластохинона С. Нами было исследовано влияние пластохинона А и пластохинона С на активность изолированной ФС2. Показано, что пластохинон С менее эффективен в качестве акцептора электронов от ФС2, чем пластохинон А. Возможно, лимитирование скорости переноса электронов на уровне ФС 2 за счет появления окисленных производных является одним из механизмов ингибирования электронного транспорта в фотосинтетической электрон-транспортной цепи хлоропластов высших растений.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 23-14-00396)

1. Kozuleva M.A., Klenina I.B., Proskuryakov I.I., Kirilyuk I., Ivanov B.N. (2011) // *FEBS Letters*, 585, 1067-1071.
2. Borisova-Mubarakshina M.M., Kozuleva M.A., Rudenko N.N., Naydov I.A., Klenina I.B., Ivanov B.N. (2012) // *Biochim. Biophys. Acta*, 1817, 1314–1321.
3. Mubarakshina M.M., Khorobrykh S.A., Ivanov B.N. (2006) // *Biochim. Biophys. Acta*. 1757, 1496–1503.
4. Borisova-Mubarakshina M.M., Naydov I.A., Ivanov B.N. (2018) // *FEBS Letters*, 592, 3221–3228.

**ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ СОДЕРЖАНИЯ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ ОКСИДАЗЫ
МИТОХОНДРИЙ НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ВЫСШИХ
РАСТЕНИЙ ПРИ ПОНИЖЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ**

А.В. Бражникова^{1,2}, Н.В. Балашов¹, И.А. Найдов¹,
М.М. Борисова-Мубаракшина¹*

¹ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия

²Биотехнологический факультет, ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

**e-mail: brazhnikovanastasia@yandex.ru*

Известно, что митохондрии многих организмов, в частности высших растений, содержат нечувствительную к действию цианида альтернативную оксидазу (АОХ), функцией которой является восстановление кислорода до воды с использованием восстановленного убихинона в качестве донора электронов. Считается, что альтернативный транспорт электронов через АОХ усиливается в условиях стресса, что предотвращает генерацию активных форм кислорода в митохондриальной электрон-транспортной цепи и, следовательно, развитие окислительного стресса в митохондриях. К настоящему времени доказана роль АОХ в термогенезе у ряда растений, однако роль АОХ в защите растений при пониженной температуре до конца не изучена.

В настоящей работе, используя растения *Arabidopsis thaliana* дикого типа и мутантные растения с гиперэкспрессией или подавлением экспрессии АОХ (antisense растения), оценивали влияние изменений содержания АОХ митохондрий на протекание фотосинтеза при пониженной температуре (6°C). У растений дикого типа через 12 дней при пониженной температуре наблюдалось снижение квантового выхода фотосистемы II (ФС II), но у мутантных растений с измененным содержанием АОХ квантовый выход ФС II оставался на том же уровне, что и в контрольных условиях. Кроме того, способность растений дикого типа диссипировать энергию в тепло также снижалась при 6°C, в то время как у обеих мутантных линий этот параметр оставался на том же уровне, что и в контрольных условиях при 21°C. Наряду с этим, у всех исследованных растений увеличивался циклический транспорт электронов вокруг ФС I. Содержание H₂O₂ в листьях мутантных растений через 12 дней при пониженной температуре практически не изменилось, в

то время как в листьях растений дикого типа оно увеличилось примерно в два раза. Кроме того, были проанализированы изменения количества АОХ в растениях с учетом изменения количества восстановленной и окисленной фракций АОХ.

Таким образом был сделан вывод о том, что изменение содержания АОХ представляет собой важный сигнал, запускающий акклимационный ответ растений на пониженную температуру. Можно сказать, что изученные растения адаптируются к стрессовым условиям путем увеличения содержания АОХ и циклического транспорта электронов вокруг ФС I. Растения дикого типа дополнительно активируют альтернативный транспорт электронов к кислороду, вероятно, из-за снижения способности диссипировать энергию в тепло, в отличие от мутантных растений с измененным содержанием АОХ, которые сохраняют эту способность.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-14-00396).

**ВЗАИМОСВЯЗЬ КРАТКОСРОЧНОГО И ДОЛГОСРОЧНОГО АДАПТАЦИОННЫХ
МЕХАНИЗМОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ СВЕТОСБОР В ВЫСШИХ РАСТЕНИЯХ**

**Relationship between short-term and long-term adaptation mechanisms
regulating light harvesting in higher plants**

Дарья Ветошкина, Николай Балашов, Марина Козулева,
Наталья Руденко, Дарья Вильянен, Илья Найдов, Роман Маркин,
Мария Борисова-Мубаракишина*

Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное
подразделение ФИЦ Пушинский научный центр биологических
исследований РАН

**e-mail: vetoshkina_d@mail.ru, тел. +7 965 1586560*

При изменении освещенности растений оптимизация фотосинтетической активности на стадии поглощения энергии квантов света происходит за счет изменений в структурно-функциональных характеристиках светособирающих антенных комплексов. Перераспределение поглощенной солнечной энергии между фотосистемами (ФС), называемое переходом состояний (state transitions), является одним из механизмов краткосрочной адаптации. Первый шаг в этом процессе - активация STN7 киназы, которая фосфорилирует белки, Lhcb1 и Lhcb2, внешней светособирающей антенны ФС II (ЛНСII), в результате чего ЛНСII отсоединяются от ФС II и связываются с ФС I. При длительном освещении растений светом высокой интенсивности происходит подавление биосинтеза белков Lhcb1 и Lhcb2, что приводит к уменьшению размера светособирающей антенны ФС II. При этом, при повышенной освещенности происходит ингибирование процесса state transitions, т.е. краткосрочного адапционного ответа. Однако детальный механизм этого ингибирования остается неясным.

Наши предыдущие исследования показали, что пероксид водорода (H₂O₂) является сигналом, запускающим регуляцию размера светособирающей антенны ФС II при длительном действии повышенной освещенности.

Целью данной работы было исследование участия STN7 киназы в долгосрочной адаптации и регуляции активности STN7 киназы при повышении освещенности. Было показано, что растения арабидопсиса с заблокированным синтезом STN7 киназы не способны адаптироваться к повышенной освещенности с помощью регуляции размера

светособирающей антенны ФС II, как растения дикого типа. Кроме того, с использованием изолированных тилакоидных мембран было показано, что добавление H_2O_2 в концентрациях 250 и 500 мкМ приводит к подавлению активности STN7 киназы при низкой освещенности.

Таким образом, увеличение количества H_2O_2 в хлоропластах при увеличении освещенности может приводить к ингибированию STN7 киназы и возвращению ЛНСII к ФС II. Это может быть важно для протеолиза Lhcb 1 и Lhcb 2 при длительном освещении светом высокой интенсивности. Пероксид водорода может представлять связующее звено между процессами краткосрочной и долгосрочной адаптации, подавляя первый и активируя второй.

Исследование было поддержано Российским научным фондом (проект № 22-74-10088).

**ВЛИЯНИЕ ПАТОГЕННОГО ГРИБА *BIPOLARIS SOROKINIANA* НА СОСТАВ
ХЛОРОФИЛЛОВЫХ ПИГМЕНТОВ В ЛИСТЬЯХ ПРОРОСТКОВ
ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ**

**Impact of the pathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana* on the state of chlorophyll
pigments in the leaves of spring barley seedlings**

Татьяна Виск, Людмила Кабашишникова*

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси

*e-mail: tania_gavrilenko@mail.ru, тел. +375 (17) 3422888

Инфицирование патогенными грибами может вызвать морфологические, биохимические и физиологические изменения в растении-хозяине. В результате патологического процесса, образуется большое количество активных форм кислорода, постоянно продуцируемых в хлоропластах, митохондриях и других компартментах растительной клетки, главным образом, в процессах фотосинтеза и дыхания. У большинства растений в процессе деградации молекул хлорофилла образуется хлорофиллид (Chlde), в результате удаления фитола с участием фермента хлорофиллазы [1]. Существует предположение, что Chlde, обладая фотодинамическими свойствами, может участвовать в защите растений [1], что определяет актуальность изучения состава хлорофилловых пигментов при различных неблагоприятных воздействиях, включая грибные инфекции.

Целью исследования являлось изучение влияния патогенного гриба *Bipolaris sorokiniana* на пул хлорофилловых пигментов в листьях проростков ярового ячменя сортов Магутны и Рейдер. Проростки выращивали на водопроводной воде при 22°C на полихроматическом белом свете (120 мкмоль квантов м⁻²с⁻¹) при 16 ч фотопериоде. В опыте 3-дневные листья ячменя инфицировали грибом *Bipolaris sorokiniana* путем равномерного опрыскивания водным раствором, содержащим 10⁶ спор/мл. Анализ состава пигментов проводили через 2 дня после инокуляции патогена. Контролем служили здоровые проростки ячменя.

Разделение фитольных и бесфитольных форм хлорофилловых пигментов проводили после экстракции 80%-ным ацетоном [2]. Для этого сначала сырые листья растирали в 80%-ном ацетоне. Затем квоты полученного водно-ацетонового экстракта добавляли в пробирки, содержащие 10 мМ КОН и гексан. Фракции разделяли центрифугированием (3-кратная повторность). Содержание фитольных (гексановая фракция) и бесфитольных (ацетоновая фракция) форм

хлорофилловых пигментов определяли спектрофотометрически (Shimadzu UV-2401 PC) по формулам, приведенным в [2].

В проведенных ранее исследованиях было выявлено, что грибное заражение приводит к одинаковому снижению фитол-содержащих форм пигментов на метаболической (9-дневные) и катаболической (12-дневные) стадиях развития проростков ячменя. В 5-дневных проростках двух сортов ячменя количество фитол-содержащих форм (хлорофилл ($a + b$) в пересчете на единицу сырой массы было примерно одинаковым и заметно не изменялось после инфицирования. При этом в инфицированных проростках сорта Магутны наблюдалось снижение содержания *Chlde a* по сравнению с контролем в 1,6 раза, тогда как в зараженных листьях сорта Рейдер этот показатель практически не изменялся.

Полученные результаты указывают на сортоспецифичность изменения относительного содержания *Chlde a* при инфицировании проростков ячменя грибом *Bipolaris sorokiniana* и являются методической основой для дальнейшего изучения механизмов иммунного ответа с участием хлоропластов.

1. Hu X. et al. // Plant Physiol. 2015. V. 167, N 3. P. 660–670.
2. Harpaz-Saad et al. // Plant Cell. 2007. V. 19. P. 1007–1022.

ПУТИ ОКИСЛЕНИЯ ПУЛА ПЛАСТОХИНОНА В ТИЛАКОИДАХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

The plastoquinone pool oxidation ways in thylakoids of higher plants

*Дарья Вильянен**, *Илья Найдов*, *Борис Иванов*,
Марина Козулева, *Мария Борисова-Мубаракишина*

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино

*e-mail: vilyadar@gmail.com, тел. +7 914 9532170

Редокс-состояние пула пластохинона (ПХ пул) – важнейший показатель функционирования фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ФЭТЦ), которая является одним из основных датчиков, сигнализирующих о состоянии окружающей растению среды. Этот уровень определяет также антиоксидантную активность ПХ пула. На свету ПХ пул восстанавливается электронами, поступающими от фотосистемы 2, и предполагается, что основной вклад в окисление ПХ пула вносит цитохромный *b₆f*-комплекс. При этом вклад иных путей окисления ПХ пула практически не исследован. В работе были изучены возможные альтернативные пути окисления ПХ пула.

Для выявления путей окисления ПХ пула измеряли его редокс-состояние в темноте через 0,1 – 600 с после освещения. Суспензию изолированных тилакоидов высших растений освещали вспышкой насыщающего красного света ($\lambda = 660$ нм) интенсивностью 3000 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ длительностью 1,5 с, затем через указанное время в темноте измеряли индукцию флуоресценции хлорофилла *a* при освещении такой же вспышкой. Для оценки редокс-состояния ПХ пула использовали относительную величину площади над кривой индукции флуоресценции (A_{fl}). Полученные зависимости A_{fl} от времени темноты представляли собой двухфазные кривые, что соответствует результатам ранее опубликованных работ. С помощью аппроксимации зависимостей A_{fl} от времени суммой двух экспоненциальных функций затухания были оценены доли «быстрой» и «медленной» фаз в окислении ПХ пула, а также $\tau_{1/2}$ каждой фазы.

Доля и величина $\tau_{1/2}$ «быстрой» фазы окисления пула ПХ после освещения зависели от эффективности оттока электронов от фотосистемы 1 (ФС1) к внешним акцепторам, что оценивали по величине стационарного уровня $P700^+$ на свету. С увеличением эффективности оттока электронов от ФС1 $\tau_{1/2}$ «быстрой» фазы снижалось от 1,53 с кислородом как

неэффективным акцептором до 0,06 с в присутствии пары ферредоксин + NADP⁺. Эти экспериментальные результаты показали, что «быстрая» фаза окисления пула ПХ в темноте включает остаточный отток электронов к P700⁺ после выключения света. С помощью варьирования интенсивности предварительного (до первой вспышки) освещения и сравнения кинетики окисления пула пластохинона в аэробных и анаэробных условиях, было обнаружено участие еще одного пути утечки электронов в окислении ПХ пула во время «быстрой» фазы. С учетом литературных данных был сделан вывод, что это может быть окисление молекул пластогидрохинона супероксидным анион-радикалом, образующемся в ФЭТЦ на свету в реакции Мелера.

«Медленная» фаза практически исчезала в анаэробных условиях, что указывало на её зависимость от присутствия кислорода. Уменьшение доли «медленной» фазы при внесении каталазы в суспензию предосвещенных тилакоидов свидетельствовало об участии H₂O₂ в окислении пула ПХ. Ускорение окисления ПХ пула при увеличении длительности и интенсивности предосвещения показало, что эта скорость зависит от накопления H₂O₂ в суспензии тилакоидов при освещении.

Таким образом, полученные результаты показали, что редокс-состояние ПХ пула на свету зависит не только от его окисления последующими компонентами ФЭТЦ, но и от продукции в ней супероксидного радикала и H₂O₂. Накопление *in vivo* в хлоропластах H₂O₂, происходящее в стрессовых условиях, может существенно влиять на редокс-состояние ПХ пула, и, соответственно, на его функции.

Данная работа поддержана Российским научным фондом (грант № 22-24-01074).

**ИССЛЕДОВАНИЕ СЕЗОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ АКТИВНОСТИ
КОРТИКУЛЯРНОГО ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ВЕТВЕЙ ЯБЛОНИ
ДОМАШНЕЙ *MALUS DOMESTICA***

**Study of seasonal changes in the activity of the corticular photosynthetic
apparatus of branches of the apple tree *Malus domestica***

*Ульяна Грязнова**, Татьяна Савченко

Институт фундаментальных проблем биологии, ФИЦ ПНЦБИ РАН

*e-mail: ulyana.gr@yandex.ru, тел. +7 915 6863515

Интерес к изучению кортикулярного фотосинтеза – фотосинтеза, протекающего в хлоренхиме внутренней коры одревесневших растений – растет [1,2]. Некоторые недавние исследования показали возможность значительного вклада кортикулярного фотосинтеза в транспорт воды в растении [3]. Было установлено, что фотосинтез, происходящий в тканях хлоренхимы внутренней коры, играет роль в радиальном росте стебля, накоплении биомассы, пробуждении почек и образовании молодых листьев [4]. Кортикулярный фотосинтез минимизирует отрицательное воздействие дефолиации, и его роль возрастает в безлиственный период жизни растений [5]. Целью данной работы стало исследование особенностей функционирования кортикулярного фотосинтетического аппарата молодых ветвей яблони домашней *Malus domestica*.

В результате еженедельного мониторинга активности кортикулярного фотосинтетического аппарата *M. domestica* в период с конца сентября 2022 года до конца мая 2023 года, было выявлено снижение значений эффективного квантового выхода с высоких (0,59) в сентябре до едва детектируемых в конце ноября (0,19) с последующим постепенным восстановлением с конца марта до максимальных значений.

Была выявлена корреляция значений эффективного квантового выхода от температуры окружающей среды: с понижением температуры показатель эффективного квантового выхода у молодых ветвей *M. domestica* так же снижается. При этом невысокие значения этого параметра наблюдались даже при отрицательных значениях температуры окружающей среды в пределах до -10 °С.

Инкубация при комнатной температуре зимних ветвей *M. domestica*, собранных при отрицательных температурах, приводит к быстрому (в течение 10-30 минут) повышению значений эффективного квантового выхода. По прошествии 3 дней значения повысились только до 0,39.

Сравнение устойчивости к повышенным температурам кортикального фотосинтетического аппарата ветвей яблони домашней *M. domestica*, собранных в разные сезоны, показал, что фотосинтетический аппарат зимних ветвей наиболее чувствителен к термическому воздействию. Также было выявлено, что максимальный квантовый выход после зимнего периода частично восстанавливается после термической обработки, в отличие от эффективного квантового выхода. Вероятно, это связано с тем, что ферментативный аппарат, связанный с темновыми реакциями фотосинтеза, не функционален, но компоненты фотосистемы II, осуществляющие фотофизические процессы, остаются функционально активными.

1. Tikhonov KG, Khristin MS, Klimov VV, Sundireva MA, Kreslavski VD, Sidorov RA, Tsidendambayev VD, Savchenko TV (2017) Structural and functional characteristics of photosynthetic apparatus of chlorophyll-containing grape vine tissue. *Russian Journal of Plant Physiology* 64(1):73–82.
2. Yanykin D, Sudyreva M, Khorobrykh A, Semenova G, Savchenko T. (2020) Functional characterization of the cortical photosynthetic apparatus in grapevine. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*: 148260.
3. Chen X, Zhao P, Zhao X, Wang Q, Ouyang L, Larjavaara M, Zhu L, Ni G. (2021). Involvement of stem cortical photosynthesis in hydraulic maintenance of Eucalyptus trees and its effect on leaf gas exchange. *Environmental and Experimental Botany*, 186, 104451.
4. Aschan G, Pfanz H (2003) Non-foliar photosynthesis – a strategy of additional carbon acquisition. *Flora* 198:81–972003.
5. Wittmann C, Pfanz H. (2008) Antitranspirant functions of stem periderms and their influence on cortical photosynthesis under drought stress. *Trees – Structure and Function* 22:187– 196.

КАРБОАНГИДРАЗЫ ХЛОРОПЛАСТОВ В АДАПТАЦИОННЫХ МЕХАНИЗМАХ РАСТЕНИЙ

Chloroplast carbonic anhydrases in plant adaptation mechanisms

*Борис Иванов**, Наталья Руденко, Людмила Игнатова,
Татьяна Хорошаева, Елена Надеева, Марина Козулева, Илья Найдов,
Дарья Ветошкина, Мария Борисова-Мубаракшина

Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное
подразделение ФИЦ Пушинский научный центр биологических
исследований РАН

*e-mail: ivboni@rambler.ru

Карбоангидразы (КА) – группа ферментов, представленная во всех клеточных организмах. КА катализируют протекание реакций гидратации углекислого газа и дегидратации бикарбоната: $\text{CO}_2(\text{p}) + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$, – увеличивая константу скорости в ряде случаев в миллион раз. В автотрофах неорганический углерод, поступающий из воздуха или воды, является источником построения самого организма. Считается очевидным, что КА требуются на его пути из среды к центрам карбоксилирования, а вблизи этих центров – для поддержания необходимой локальной концентрации бикарбоната или CO_2 . Другие функции этих ферментов в высших растениях только начинают выявляться. В сообщении представлены данные, позволяющие предположить, что КА хлоропластов участвуют в приспособлении растений к условиям среды.

Изменение уровней экспрессии генов КА хлоропластов обнаружено при изменении освещенности растений. Увеличение или уменьшение уровня экспрессии гена конкретной КА зависело от длины фотопериода и времени вегетации при высокой или низкой освещенности [1]. Изменения КА активностей стромы хлоропластов и тилакоидов, а также изменение экспрессии генов, кодирующих КА этих структур, происходили и при изменении содержания CO_2 в воздухе во время выращивания [2]. Отсутствие ряда хлоропластных КА в одиночных нокаутных мутантах вызывало в ответ на варьирование факторов внешней среды изменения в фотосинтетическом аппарате таких растений, отличные от соответствующих изменений в этом аппарате растений дикого типа [3], а также изменения уровней экспрессии генов-регуляторов гормональных

путей. Это указывало на вовлеченность функциональной активности таких КА в процессы приспособления растений к смене внешних условий [4].

С помощью нокаутных мутантов были изучены механизмы участия тилакоидных КА, альфа-КА2, альфа-КА4 и альфа-КА5, в фотосинтетических реакциях, что позволяет предположить, как эти КА могут быть вовлечены в приспособление растений к изменению внешних условий [4, 5, 6].

Изменения при нокаутировании гена одной из хлоропластных КА уровней экспрессии генов других КА хлоропласта, а также КА активности изолированных фракций хлоропластов предполагают кооперативное участие хлоропластных КА в фотосинтезе.

1. Руденко Н.Н., Ветошкина Д.В., Федорчук Т.П., Иванов Б.Н. (2017) Биохимия, 82, 1318–1329.
2. N. Rudenko, L. Ignatova, I. Naydov, N. Novichkova, B. Ivanov (2022) Plants, 11, 2113.
3. N. Rudenko, T. Fedorchuk, V. Terentyev, O. Dymova, I. Naydov, T. Golovko, M. Borisova-Mubarakshina, B. Ivanov (2020) Protoplasma, 257, 489–499.
4. Журикова Е.М., Игнатова Л.К., Руденко Н.Н., Мудрик В.А., Ветошкина Д.В., Иванов Б.Н. (2016) Биохимия, 81, 1463 – 1470.
5. E. Nadeeva, L. Ignatova, N. Rudenko, D. Vetoshkina, I. Naydov, M. Kozuleva, B. Ivanov (2023) Plants, 2023, 12(9), 1763.
6. T. Fedorchuk, I. Kireeva, V. Opanasenko, V. Terentyev, N. Rudenko, M. Borisova-Mubarakshina, B. Ivanov (2021) Front. Plant Sci. 12:662082.

**ВЛИЯНИЕ LED-ОСВЕЩЕНИЯ РАЗНОГО СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА НА
ФОТОСИНТЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА ПРИ ФУЗАРИОЗЕ**

**Impact of LED-lighting with different spectra on the photosynthetic activity of
cucumber plants under fusarium wilt**

Людмила Кабашикова^{1*}, Ирина Доманская¹, Ольга Молчан²

¹Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси

²Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича

*e-mail: kabashnikova@mail.ru, тел. +375 (17) 3422888

Во многих регионах мира овощные культуры, включая огурец, выращиваются в теплицах или других защищенных помещениях. Светодиодная технология предлагает значительно улучшенную энергоэффективность освещения, а также контроль над спектральным составом света. Влияние света на иммунитет растений при атаке разных типов патогенов (грибов, бактерий, вирусов) изучалось длительное время, но чаще в темноте [1], чем на свету и, в основном, на мутантах арабидопсиса. Недавние исследования показали, что на основе синхронизации атаки патогенов со световыми циклами и компромиссов между ростом и защитой, световые сигналы играют важную роль в модуляции защитных реакций [2,3]. В этой связи актуальным является изучение эффектов LED-освещения разного спектрального состава на фотосинтетическую активность растений огурца при фузариозе.

Объектом исследования служили 28-дневные растения огурца сорта Кустовы, сформированные при светодиодном освещении с преобладанием красного (КС) или дальнего красного (ДКС) и зараженные грибом *Fusarium oxysporum* sp. (F.ox.). Преобладание КС или ДКС способствовало увеличению содержания хлорофилла и каротиноидов в пересчете на сухую массу листа по сравнению с растениями, выращенными на белом свету (БС). В зараженных растений, выращенных в режимах БС или КС, наблюдалось увеличение общего содержания хлорофилла и каротиноидов относительно здоровых растений, однако отмечено снижение этих показателей на ДКС.

В здоровых листьях огурца, выращенных в режимах преобладания КС или ДКС отмечено увеличение активности фотосистемы (ФС)1 и ФС2 по сравнению с БС. Заражение растений, выращенных в условиях БС, не вызывало изменений функциональных показателей ФС2 на фоне

незначительного снижения активности ФС1. В режимах КС и ДКС отмечено снижение фотохимической активности ФС1 и ФС2 в зараженных листьях.

Активность аскорбатпероксидазы – одного из важных антиоксидантных ферментов в хлоропластах снижалась в здоровых листьях огурца на КС и ДКС по сравнению с БС и увеличивалась в зараженных листьях по сравнению со здоровыми при всех режимах освещения, особенно сильно – на КС.

Полученные результаты демонстрируют различные механизмы ответа хлоропластов огурца на заражение возбудителем фузариозного увядания в зависимости от световых условий формирования фотосинтетического аппарата и могут быть использованы в качестве научной основы для повышения устойчивости растений огурца к фузариозу.

1. Ballare C.L. Light regulation of plant defense // *Annu Rev Plant Biol.* 2014. Vol. 65. P. 335-363. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050213-040145.
2. Wang H., Wu G., Zhao B. Regulatory modules controlling early shade avoidance response in maize seedlings // *BMC Genomics.* 2016. V.17. P.269. DOI: 10.1186/s12864-016-2593-6.
3. Fernandez-Milmanda G.L., Crocco C.D., Reichelt M. A light-dependent molecular link between competition cues and defence responses in plants // *Nat. Plants.* 2020. Vol. 6. P.223-230. DOI: 10.1016/j.molp.2020.11.021.

ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ АНТЕННЫ ФОТОСИСТЕМЫ 2 В ВЫСШИХ РАСТЕНИЯХ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЗАСУХИ И ЗАСОЛЕНИЯ

Changes in photosystem 2 antenna functioning in higher plants under drought and salinity

Роман Маркин, Николай Балашов, Мария Борисова-Мубаракишина,
Дарья Ветошкина, Борис Иванов*

Институт Фундаментальных Проблем Биологии РАН

*e-mail: romanmarkin998@gmail.com, тел. +7 985 0931499

Засуха и засоление – одни из наиболее распространенных стрессовых условий, действию которых подвергаются растения. Поэтому, исследование механизмов адаптации растений к этим факторам имеет большое практическое значение. Адаптация фотосинтетического аппарата происходит за счет разных механизмов; включая изменения в структурно-функциональных характеристиках светособирающих комплексов (ССК) фотосистем. Краткосрочным механизмом адаптации на уровне ССК фотосистемы 2 (ФС2) является перераспределение части ССК ФС2 между ФС2 и ФС1 (state transitions). Показано, что протекание этого механизма имеет большое значение при изменении спектрального состава падающего света и ингибируется при освещении светом высокой интенсивности. При длительном действии повышенной освещенности происходит подавление биосинтеза белков ССК ФС2, приводящее к уменьшению размера антенны ФС2.

В данной работе исследовали влияние краткосрочного и долгосрочного воздействия засухи и засоления почвы на протекание state transitions и на размер ССК ФС2. 10-ти – 14-ти дневные проростки ячменя обыкновенного (*Hordeum vulgare*) подвергались воздействию, моделирующему действие засухи (отсутствие полива) и засоления (полив раствором 200 мМ NaCl). Для оценки протекания state transitions измеряли флуоресценцию хлорофилла *a* при комнатной температуре и рассчитывали параметр Fr, величина которого отражает протекание state transitions. Через 1 день после начала действия стрессовых факторов не было обнаружено значимых различий в параметре Fr между контрольными растениями и растениями, подвергшимися действию стресса. Значение Fr достоверно снижалось на 3-й день действия засоления по сравнению с таковым для контрольных растений, а на 6-й день вновь возрастало и составляли примерно 80% от контроля. Действие засухи развивалось медленнее и снижение параметра Fr регистрировали на 6 день

после прекращения полива. Снижение state transitions коррелировало с изменением содержания фосфорилированных белков ССК ФС2, накопление которых является первым этапом state transitions.

Действие засоления и засухи вызывает увеличение содержания пероксида водорода в листьях растений. Возрастание содержания пероксида водорода может служить причиной ингибирования процесса state transitions и приводить к запуску долгосрочной регуляции размера ССК ФС2, что ранее было показано для действия повышенной освещенности (Borisova-Mubarakshina et al., 2015). С помощью измерения быстрой флуоресценции хлорофилла *a* регистрировали уменьшение эффективного размера антенны при длительном действии засоления почвы (более 5-7 дней) и длительном действии засухи (10-14 дней). Уменьшение размера ССК ФС2 коррелировало с увеличенным образованием пероксида водорода и увеличенным содержанием аскорбатпероксидазы, как и при действии повышенной освещенности.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 22-74-10088).

1. Borisova-Mubarakshina, M. M., Ivanov, B. N., Vetoshkina, D. V., Lubimov, V. Y., Fedorchuk, T. P., Naydov, I. A., Kozuleva, M. A., Rudenko, N. N., Dall'Osto, L., Cazzaniga, S., & Bassi, R. (2015). Long-term acclimatory response to excess excitation energy: evidence for a role of hydrogen peroxide in the regulation of photosystem II antenna size. *Journal of experimental botany*, 66(22), 7151–7164.

**ВЛИЯНИЕ НОКАУТА АЛЬФА-КАРБОАНГИДРАЗЫ 2 НА
НЕФОТОХИМИЧЕСКОЕ ТУШЕНИЕ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ
ХЛОРОФИЛЛА А В *ARABIDOPSIS THALIANA***

The influence of α -carbonic anhydrase 2 knockout on the non-photochemical quenching of chlorophyll *a* fluorescence in *Arabidopsis thaliana*

*Елена Надеева**, Людмила Игнатова, Наталья Руденко,
Дарья Ветошкина, Борис Иванов

Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН» – обособленное подразделение
Институт фундаментальных проблем биологии РАН

*e-mail: zhurikova-alena@yandex.ru

Нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a* (НФТ) представляет собой сложный механизм, используемый высшими растениями для регулирования диссипации избыточного поглощенного света. Основным механизмом НФТ является энергозависимое НФТ, которое зависит от концентрации протонов в люмене тилакоидов и активируется протонированием белка PsbS и виолаксантиндеэпоксидазы. Кроме того, вклад в НФТ вносит процесс, называемый «state transitions» (ST). ST представляет собой механизм акклимации, при котором происходит перераспределение поглощенной энергии возбуждения между двумя фотосистемами (ФС) за счет обратимой миграции части светособирающего комплекса ФС2 (ССК2) между ФС2 и ФС1. Ранее нами показано, что в растениях *Arabidopsis thaliana* без α -карбоангидразы 2 (α -КА2), катализирующей реакцию $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$, при высокой интенсивности света величина НФТ была больше по сравнению НФТ растений дикого типа (ДТ) за счет энергозависимого компонента НФТ. На растениях ДТ и мутантных растениях с нокаутом α -КА2 исследован другой компонент НФТ, характеризующий ST.

Уровни экспрессии генов, кодирующих и мажорные белки ССК2 Lhcb1 и Lhcb2, и минорные белки Lhcb3, Lhcb4 и Lhcb6 были выше в мутантах, чем в ДТ. С помощью Вестерн-блот анализа было обнаружено, что общий размер ССК2 в мутанте больше, чем в ДТ за счет большего содержания мажорных белков Lhcb1 и Lhcb2. При этом содержание фосфорилированных белков Lhcb1 и Lhcb2 в мутанте по α -КА2 было меньше, чем в ДТ, что может свидетельствовать об изменении в мутантных растениях активности STN7 киназы – ключевого фермента,

инициирующего процесс ST. Поэтому в мутантных растениях и в растениях ДТ был оценен процесс ST.

Измерение низкотемпературной флуоресценции хлорофилла *a* показало, что при освещении светом возбуждающим предпочтительно ФС2 в растениях ДТ, происходило изменение отношения пиков флуоресценции ФС1/ФС2 на 22%, а в мутанте по α -КА2 на 8-13% по сравнению с значениями, полученными после адаптации к темноте. Обратный переход части ССК2 от ФС1 к ФС2 оценивали с помощью измерения флуоресценции хлорофилла *a* при комнатной температуре и расчета параметра NPQ. В мутанте по α -КА2 ST-зависимая релаксация NPQ была в 2 раза ниже, чем в растениях ДТ. Таким образом, обнаружена более низкая способность мутантных растений с заблокированным синтезом α -КА2 осуществлять процесс state transitions по сравнению с растениями ДТ.

Работа поддержана грантом РНФ № 22-74-10088.

ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ К ЗАСУХЕ И СОЛЕВОМУ СТРЕССУ ПО ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ-ПРЕДИКТОРАМ

Evaluation of resistance of barley plants to drought and salt stress by photosynthetic indicators-predictors

*Юлия Немцова**, *Дарья Кузнецова*, *Владимир Воденев*, *Марина Гринберг*

ННГУ им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород,
пр. Гагарина, 23, Российская Федерация

*e-mail: julnemtova@yandex.ru, тел. +7 908 1511200

Выведение улучшенных сортов сельскохозяйственных растений методами геной инженерии требует контроля качества проростков: оценки их продуктивности и устойчивости к стрессорам, включая засуху и засоление. Такая оценка может быть произведена при помощи систем высокопроизводительного фенотипирования, а именно фенотипирования на основе флуоресценции хлорофилла и анализа ряда параметров фотосинтеза. Ввиду его ключевой роли в растении и в связи с высокой степенью сопряжения между состоянием фотосинтетического аппарата и растения в целом, ряд фотосинтетических показателей потенциально может быть использован в качестве предикторов устойчивости к различным стрессорам.

Целью настоящей работы являлось тестирование в контролируемых условиях продуктивности и устойчивости исходных сортов ячменя к засухе и солевому стрессу.

Исследования проводились на растениях ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сортов «Леон», «Ратник» и «Фокс». Засуха моделировалась прекращением полива; солевой стресс моделировался поливом растений раствором NaCl. Морфометрические показатели оценивались по длине листьев, сухому и сырому весу. Параметры световой стадии фотосинтеза регистрировались при помощи РАМ-флуориметра PlantExplorerPro+ (PhenoVation, Нидерланды). Для регистрации уровня ассимиляции использовался инфракрасный газоанализатор GFS-3000 с измерительной головкой Dual-РАМ gas-exchange Cuvette 3010-Dual (Heinz Walz GmbH, Германия).

В ходе исследования у растений разных сортов обнаружена высокая степень соответствия между ответами морфометрических и фотосинтетических показателей. Исходя из полученных результатов, фотосинтетические показатели могут быть использованы для быстрого фенотипирования новых линий растений ячменя, потенциально

устойчивых к стрессорам. Для засухи наиболее перспективным прогностическим показателем представляется уровень $Y(II)$, отражающий активность работы фотосистемы II, в то время как для солевого стресса наилучшее соответствие продемонстрировал уровень Fv/Fm , связанный со структурной целостностью этой фотосистемы. Наблюдаемые различия могут быть обусловлены природой рассмотренных стрессоров, а именно соотношением вклада осмотических и токсических повреждений, которые они вызывают в растениях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки (проект № 075-15-2021-1068).

**ВЛИЯНИЕ КАТИОННЫХ АНТИСЕПТИКОВ НА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ И ТРАНСПОРТ ЭЛЕКТРОНА
В КОМПЛЕКСАХ ФС2 И ФС1**

**Effect of cationic antiseptics on fluorescence characteristics and electron transport
in PS2 and PS1 complexes**

*В. Пащенко¹, Е. Лукашев¹, М. Мамедов², Д. Гвоздев¹,
Б. Корватовский^{1*}, П. Нокс¹, Н. Сейфуллина¹, М. Страховская¹*

¹Биологический факультет Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, стр. 12, Москва, Россия 119234

²Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
Московского государственного университета, Ленинские горы, д. 1, стр.
40, Москва, Россия 119992

**e-mail: korbor@biophys.msu.ru, тел. +7 903 5133481*

Ранее мы исследовали влияние катионных антисептиков октенидина, мирамистина, хлоргексидина и пиклоксидина на спектральные свойства и процессы трансформации энергии в хроматофорах пурпурных бактерий *Rba. sphaeroides* и *R. rubrum* [1,2]. Эти исследования были продолжены на изолированных из высших растений активных коровых комплексах ФС2 с интактным комплексом окисления воды и на коровых комплексах ФС1 из цианобактерии *Synechocystis sp. PCC6803*.

В комплексах ФС2 обнаружено, что характерные эффекты – увеличение выхода флуоресценции светособирающих пигментов и замедление скорости миграции энергии, которые мы наблюдали на хроматофорах фотосинтетических бактерий, отчетливо проявляются лишь в присутствии октенидина. Также, обнаружен новый эффект: по мере увеличения концентрации данного антисептика спектры поглощения и флуоресценции сдвигается в коротковолновую область. При этом на порядок возрастает интегральная величина свечения. Сходным образом увеличивается и средняя длительность флуоресценции. Аналогичные эффекты были обнаружены и при добавлении к препаратам ФС2 детергента Тритон X-100. Сделан вывод, что влияние антисептика заключается прежде всего, в воздействии на структуру светособирающей антенны (CP43 и CP47), через которую энергия возбуждения в образцах доставляется к собственно РЦ. В результате этого воздействия происходит дестабилизация молекул хлорофиллов в данной структуре и изменение их оптических и функциональных характеристик.

Сходные эффекты наблюдались также в цианобактериальных комплексах ФС1 в присутствии октенидина: интенсивность флуоресценции увеличивалась примерно в 15 раз, а скорость переноса энергии замедлялась аналогичным образом. Было высказано предположение, что октенидин влияет на два типа взаимодействий: (i) взаимодействия молекул Хл со структурными белками и (ii) взаимодействия пигментно-белковых комплексов с РЦ-комплексами посредством передачи возбужденной энергии (фактор связности). Кроме того, этот антисептик также влияет на скорость эквипризации возбуждения в антенном комплексе PSI. Установлено также, что октенидин значительно влияет на скорость переноса электронов в комплексе PSI. Так, при концентрации октенидина 110 мкМ время переноса электронов из $(FA/FB)^-$ во внешнюю среду увеличивается с 32 мс до 79 мс, в то время как скорость обратного переноса электронов из $(FA/FB)^-$ к $P700^+$ уменьшается с 54 мс до 25 мс. Другими словами, в присутствии октенидина электрон с концевой акцептора $(FA/FB)^-$ рекомбинирует в два раза быстрее с $P700^+$ и, следовательно, перемещается в среду медленнее. Таким образом, октенидин оказывает сильное влияние на процессы преобразования световой энергии компонентами фотосинтетического аппарата не только у пурпурных бактерий, но также фототрансформирующими комплексами цианобактерий и высших растений. Последствия его использования в больших масштабах могут оказать негативное воздействие на окружающую среду.

1. Strakhovskaya MG, Lukashev EP, Korvatovskiy BN et al. The effect of some antiseptic drugs on the energy transfer in chromatophore photosynthetic membranes of purple non-sulfur bacteria *Rhodobacter sphaeroides*. *Photosynth Res.* 2021;147: 197–209.
2. Knox PP, Lukashev EP, Korvatovskiy BN. et al. Disproportionate effect of cationic antiseptics on the quantum yield and fluorescence lifetime of bacteriochlorophyll molecules in the LH1-RC complex of *R. rubrum* chromatophores. *Photosynth Res.* 2022; 153: 103–112.

МАТЕМАТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ФОТОСИСТЕМЫ II

Model Approaches for Estimation of Photosystem II Heterogeneity

*Татьяна Плюснина**, Сергей Хрущев, Наталья Дегтерева,
Галина Ризниченко, Андрей Рубин

Биологический факультет Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия

*e-mail: plusn@yandex.ru; +7 495 9391402

Фотосистема II (ФСII) — один из основных пигментно-белковых комплексов фотосинтеза, обладающий высокой чувствительностью к неблагоприятным факторам внешней среды. Неоднородность свойств ФС II необходима для устойчивости автотрофных организмов к стрессовым факторам. Оценка гетерогенности ФС II может быть использована в экологическом мониторинге для оперативного выявления загрязнения окружающей среды.

Мы предлагаем подход к оценке гетерогенности кислород-выделяющего комплекса (КВК) ФС II и светособирающей антенны, основанный на математическом моделировании формы кривой индукции флуоресценции хлорофилла *a* образцов, обработанных 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевиной (DCMU). Иерархия характерных времен рассматриваемых в модели процессов позволяет свести модель к системе трех обыкновенных дифференциальных уравнений. Аналитическое решение редуцированной модели с тремя состояниями выражается в виде суммы двух экспоненциальных функций и точно воспроизводит решение всей системы во временном диапазоне от микросекунд до сотен миллисекунд. Сочетание нескольких таких моделей реакционных центров с разными свойствами позволило использовать ее в качестве инструмента для изучения гетерогенности ФСII.

Используя комбинированную модель, мы проанализировали кривые индукции флуоресценции, полученные для образцов, обработанных DCMU: 1) для культуры клеток *Chlamydomonas* при различном освещении; 2) для культуры клеток *Scenedesmus* после кратковременного нагревания с последующим охлаждением; 3) для культуры клеток *Chlorella*, выращенной на полной среде и в условиях азотного голодания. Для уменьшения числа степеней свободы и получения

однозначной аппроксимации для каждого случая анализа идентификация параметров походилась одновременно для всего набора кривых. Для всех случаев была проведена оценка соотношения центров с различным размером антенн (альфа- и бета-центров), а также определена доля активных и неактивных КВК. Модель позволила выявить неочевидные связи между формой кривой индукции флуоресценции хлорофилла *a* и параметрами электронного транспорта в РЦ ФСII.

Поскольку гетерогенность фотосинтетического аппарата необходима для его адаптации к неблагоприятным факторам внешней среды, мы полагаем, что предложенный подход к анализу состояния фотосинтетического аппарата растений и микроводорослей будет полезен как для понимания механизмов функционирования фотосинтетического аппарата так и для решения прикладных задач.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-11-00009.

**ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СИГНАЛОВ, ВЫЗВАННЫХ ЛОКАЛЬНЫМ
ВОЗДЕЙСТВИЕМ СВЕТА И НАГРЕВА У ПШЕНИЦЫ ЯРОВОЙ НА
ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ В УСЛОВИЯХ
ОТКРЫТОГО ГРУНТА ПРИ ПОЛИВЕ И ЗАСУХЕ**

**Influence of electrical signals caused by local action to light and heating in wheat
plant on photosynthetic parameters by grown in open ground conditions during
irrigation and drought**

*Алёна Попова**, Юрий Золин, Екатерина Сухова,
Владимир Сухов, Любовь Юдина

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского

*e-mail: SilverKumiho@mail.ru, тел: +7 920 2931430

При воздействии неблагоприятных факторов на растения у них генерируются электрические сигналы, которые вызывают изменения физиологических параметров целого растения. Наиболее быстрым и ранним сигналом стресса является электрический сигнал (ЭС) по типу деполаризации (ДЭС). Однако для генерации потенциала действия требуются условия длительного покоя, а для генерации переменного потенциала необходимо воздействие, которое будет повреждать участки растения. Условия покоя и воздействие повреждающего характера не характерны для открытого грунта, поэтому нами была выбрана комбинация неповреждающих воздействий: света и умеренного нагрева, которые более характерны для таких условий и известно, что такое воздействие может вызывать слабоизученные сигналы по типу гиперполяризации (ГЭС). Целью нашей работы стало исследование влияния электрических сигналов на фотосинтетические параметры в условиях открытого грунта при орошении и засухе.

Измерения проводили на 13-14ти дневных проростках мягкой яровой пшеницы сорта «Дарья» (*Triticum aestivum* L.). Растения выращивались в условиях открытого грунта при естественном освещении. Полив растений происходил вручную, 3 дня в неделю. Неконтролируемый полив был исключен. Для генерации электрических сигналов осуществлялось локальное воздействие комбинации света (540 мкмоль м⁻² с⁻¹, синий свет) в течение 10 минут, и нагрева (40°C) 30 минут до конца эксперимента. Параметры фотосинтеза оценивались с помощью РАМ-флуориметра Open FluorCam FC 800-О/1010.

В условиях открытого грунта у молодых растений чаще генерировались сигналы по типу ДЭС, а у более взрослых по типу ГЭС. В условиях засухи возникали только ДЭС.

Исследования фотосинтетических параметров показали, что у 16-17 дневных растений в условиях полива локальное воздействие не вызывало изменений на разных расстояниях от зоны стимуляции. У 23-24 дневных растений в условиях полива наблюдалось снижение ΔYII и небольшое увеличение ΔNPQ , подтверждающее, что именно ГЭС вызывали изменения активности параметров фотосинтеза у растений. В условиях слабой почвенной засухи – 3 дня, комбинированное воздействие не влияло на ΔYII и ΔNPQ . При умеренной засухе – 6-7 дней, воздействие вызывало снижение ΔYII на расстоянии 5 и 7 см от стимулированной зоны листа и возрастание ΔNPQ на расстояниях 5, 7 и 9 см. При сильной засухе – 13-14 дней, изменения фотосинтетических параметров не наблюдалось. Так как ЭС в условиях полива не вызывали изменения активности фотосинтетических параметров, это позволяет предположить, что именно засуха изменяет порог ответа фотосинтеза на ЭС, а также его локализацию. Поскольку детальное изучение влияния электрических сигналов на параметры фотосинтеза в условиях открытого грунта достаточно важно и иногда противоречиво, данная тема требует дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 21-74-10088.

**ПРОДУКЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА КЛЕТКАМИ
МИКРОВОДОРОСЛИ *LOBOSPHERA INCISA* IPPAS C-2047
ПРИ ДЕЙСТВИИ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ**

**Production of reactive oxygen species by microalgae *Lobosphaera incisa* IPAS
C-2047 cells exposed to stress factors**

В.В. Птушенко^{1,2*}, *Г.Н. Бондаренко*³, *Е.С. Глаголева*^{1,4}, *Е.С. Лобакова*⁴,
О.С. Птушенко^{1,4}, *А.Е. Соловченко*⁴, *Б.В. Трубицин*⁵, *К.А. Шибзухова*^{1,4}

¹НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского
Московского государственного университета
имени М.В. Ломоносова (МГУ)

²Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН

³Химический факультет МГУ

⁴Биологический факультет МГУ

⁵Физический факультет МГУ

*e-mail: ptush@belozersky.msu.ru, тел. +7 495 9391454

При действии на растение неблагоприятных факторов, как правило, возникают условия для снижения фотоассимиляционной активности и развития светового и окислительного стресса. Фотосинтетический аппарат (ФСА) растений использует ряд механизмов для снижения световой нагрузки на фотосинтетическую антенну и, тем самым, для предотвращения развития окислительного стресса. Ранее нами было показано, что при акклимации культуры клеток психротолерантной микроводоросли *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047 к низкой (около 0 °С) температуре в ФСА усиливается тепловая диссипация поглощённой энергии света, что сопровождается на первом этапе (3-5 суток) ростом экспрессии генов фотозащитных белков PsbS и LhcSR [1,2]. Однако оставался неясным вопрос, в какой мере этот защитный механизм предохраняет клетки от окислительного стресса. В данной работе мы исследовали продукцию активных форм кислорода клетками *L. incisa* IPPAS C-2047, экспонированными действием низкой температуры, а также некоторых других стрессовых факторов. В результате было показано, что накопление наиболее стабильной АФК, пероксида водорода, заметно ниже в суспензии клеток, акклимированных к низкой температуре, чем в культуре клеток, выращенных в нормальных условиях (контрольная суспензия). Более того, преимущество (меньшая скорость генерации АФК) клеток, акклимированных к низкой температуре, перед контрольной суспензией сохраняется и в том случае, если они помещены в одинаковые

условия (низкая температура). Таким образом, можно говорить об эффективности индуцируемой тепловой диссипации поглощённой в ФСА энергии света как механизма, снижающего риск окислительного повреждения клетки.

Работа была поддержана Российским научным фондом (грант № 22-24-00323).

Литература.

1. Птушенко и др. (2021) Действие низких положительных температур на фотосинтетический аппарат микроводоросли *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047, *Биохимия*, 86(12), 1853-1864.
2. Птушенко и др. (2022) Индукция экспрессии фотозащитных белков PsbS и LhcSR в клетках зелёной микроводоросли *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047 под действием низкой положительной температуры, *Биохимия*, 87(12), 2089-2098.

**ВЛИЯНИЕ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ РАЗНОЙ ПРИРОДЫ НА ИНДУКЦИЮ
НЕФОТОХИМИЧЕСКОГО ТУШЕНИЯ В КЛЕТКАХ МИКРОВОДОРОСЛИ
LOBOSPHAERA INCISA IPPAS C-2047 ПРИ АККЛИМАЦИИ
К НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ**

**The effect of stress factors of different nature on the chilling-induced
nonphotochemical quenching in the microalgae
Lobosphaera incisa IPPAS C-2047 cells**

О.С. Птушенко^{1,2*}, *Е.С. Глаголева*^{1,2}, *Е.С. Лобакова*², *В.В. Птушенко*^{1,3},
*А.Е. Соловченко*², *К.А. Шибзухова*^{1,2}

¹НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (МГУ)

²Биологический факультет МГУ

³Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН

*e-mail: ksyun88ster@gmail.com, тел. +7 495 9391454

Инкубация микроводорослей *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047 при низкой (около 0 °С) температуре приводит развитию нефотохимического тушения в фотосинтетической антенне и снижению активности фотосистемы II (ФСII) [1]. Однако непродолжительное воздействие какого-либо другого стрессового фактора на ещё не акклимированную к низкой температуре культуру клеток может повлиять на интенсивность тушения и динамику его индукции. Мы показали, что воздействие на культуру света высокой интенсивности приводит к «закалке» фотосинтетического аппарата (ФСА) микроводоросли. А именно, ФСА оказывается менее подвержен фотоингибированию, а активность ФСII по мере низкотемпературной акклимации падает медленнее, чем в контрольной суспензии. В то же время, предварительное воздействие другого стрессового фактора, повышенной концентрации CO₂ в среде инкубации, также приводит к более медленному падению активности ФСII по мере низкотемпературной акклимации, хотя практически не даёт клеткам преимущества в большей устойчивости к фотоингибированию. Мы предполагаем, что такое различие в характере «закалки» ФСА микроводорослей может быть связано с различной индукцией экспрессии белков PsbS и LhcSR, более выраженной в случае воздействия интенсивного освещения.

Работа была поддержана Российским научным фондом (грант № 22-24-00323).

1. Птушенко и др. (2021) Действие низких положительных температур на фотосинтетический аппарат микроводоросли *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047, *Биохимия*, 86(12), 1853-1864.

УСТАНОВЛЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ФОТОИНГИБИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНОЙ ЦЕПИ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Е.С. Пыхова^{1,2}, Д.В. Вильянен²,
М.М. Борисова-Мубаракишина², М.А. Козулева²*

¹Пушчинский филиал ФГБОУ ВО РОСБИОТЕХ – ПушГЕНИ-филиал
РОСБИОТЕХ, Пушкино, Россия

²Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное
подразделение ФИЦ Пушкинский научный центр биологических
исследований РАН, Пушкино, Россия

**e-mail: katkarw@yandex.ru, тел. +7 912 5518685*

В условиях избыточной освещенности фотосинтетический аппарат высших растений может подвергаться фотодеструкции, приводящей к потере его активности, то есть фотоингибированию. Понимание того, как этот аппарат регулируется, защищается, а также повреждается и восстанавливается, имеет огромное фундаментальное и прикладное значение.

Целью данного исследования являлось изучение условий, приводящих к потере активности фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ФЭТЦ). Объектом исследования служили интактные тилакоидные мембраны из листьев гороха посевного (*Pisum sativum*), выделенные по стандартной методике. Далее тилакоидные мембраны освещали в заданных условиях, пересаждали и концентрировали, брали аликвоты для определения активности фотосистемы 1 (ФС 1), фотосистемы 2 (ФС 2) и всей ФЭТЦ на кислородном электроде.

Показано, что в присутствии эффективных акцепторов электронов (искусственных акцепторов – метилвиологена (МВ) и феррицианида калия или природных – ферредоксина и НАДФ⁺) развитие фотоингибирования ФС 2 и полной ФЭТЦ усиливается с увеличением времени и интенсивности освещения – в отличие от ФС 1, активность которой при этом не изменяется. Добавка МВ влияла на потерю активностей ФС 2 и ФЭТЦ в меньшей степени, чем добавка феррицианида калия. Внесение NH₄Cl в качестве соединения, диссипирующего протонный градиент на тилакоидной мембране, приводило к более сильному ингибированию ФС 2 и полной цепи. С помощью варьирования наличия таких

антиоксидантных агентов, как супероксиддисмутаза, каталаза, а также хелатора ионов железа (десферал), установлено, что потеря активности ФС 2 и полной ФЭТЦ не связана с активными формами кислорода, генерируемыми МВ на свету. В отсутствие МВ потеря активности ФС 2 и полной цепи была значительно меньше, чем в присутствии МВ, и наличие NH_4Cl улучшало сохранение активностей ФС 2 и ФЭТЦ. В отсутствие МВ, когда только кислород – непосредственный акцептор электронов от ФС 1, наблюдали сильное ингибирование ФС 1, которое не зависело от наличия NH_4Cl . Была выдвинута гипотеза, что на фотоингибирование ФЭТЦ, определяемое в первую очередь потерей активности ФС 2, влияет скорость электронного транспорта в ФС2: чем она выше, тем более выражено фотоингибирование, вероятно вследствие происходящих конформационных изменений в ФС 2, ведущих к снижению активности этого пигмент-белкового комплекса и, как следствие, всей цепи.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-14-00396.

**РАЗРАБОТКА И АНАЛИЗ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ПРИ
КОМБИНИРОВАННОМ ВЛИЯНИИ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ**

**Development and analysis of a mathematical model under the combined
influence of abiotic factors**

*Дарья Ратницына**, Екатерина Сухова, Владимир Сухов

Университет Лобачевского,
603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23

*e-mail: *Dasha-lola1997@mail.ru*, тел. +7 910 1310092

Фотосинтез представляет собой сложный биохимический и биофизический процесс, который подвержен влиянию изменениям окружающей среды. Эти изменения могут оказывать негативное влияние на процессы жизнедеятельности растений и воспринимаются растениями как стрессоры. При этом стоит отметить, что каждый фактор воздействует не сам по себе, а комбинированно с другими. Изучение влияния стрессоров на фотосинтез важно как с фундаментальной, так и с прикладной точек зрения.

Одним из эффективных неинвазивных методов изучения фотосинтеза является математическое моделирование. Относительно простой и широко используемой моделью фотосинтетических процессов является модель Farquhar-von Caemmerer-Berry (FvCB) [1]. Эта модель достаточно детально описывает темновую стадию фотосинтеза (фиксацию углекислого газа CO_2) и упрощенно моделирует световую стадию. Модель FvCB предполагает, что скорость фиксации CO_2 ограничивается скоростью самого медленного процесса фотосинтеза. В исходном варианте модели отсутствует описание негативного влияния стрессоров на фотосинтетические процессы [2;3].

Нами разработана модель на основе модели FvCB с включением блока, описывающего обратимое повреждение фотосинтетического аппарата с помощью специальных коэффициентов при световых и темновых реакциях фотосинтеза. Разработанная модель была параметризована и верифицирована на основании экспериментальных данных (проростки гороха). В ходе эксперимента исследовали параметры световой (квантовые выходы фотосистем I и II, которые использовали для расчета потоков электронов через электрон-транспортную цепь, ETR и коэффициент нефотохимического тушения, q_N) и темновой (фотосинтетическая ассимиляция CO_2 (A_{hv}), содержание углекислого газа

во внеклеточном пространстве (Ci) стадий фотосинтеза, температуру листа, а также темновое дыхание (Rd).

Анализ разработанной и параметризованной модели при имитации комбинированного влияния стрессоров и при различных интенсивностях света показал ряд важных эффектов. Так, фотоповреждение развивается даже при низких интенсивностях света, что хорошо согласуется с экспериментальными данными; в то же время, развитие дополнительного повреждения при действии стрессора имеет пороговый характер. Комбинированное влияние факторов показывает наибольшее повреждение фотосинтетического аппарата при снижении темновых реакций при высокой скорости световых реакций.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-14-00127).

1. Von Caemmerer S., Farquhar G., Berry J. Biochemical model of C3 photosynthesis. In: *Photosynthesis in silico. Advances in Photosynthesis and Respiration*. Eds Laik A., Nedbal L., Govindjee. Dordrecht: Springer – 2009 – PP. 209–230.
2. Farquhar G.D., von Caemmerer S., Berry J.A. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C 3 species. // *Planta*. – 1980 – Vol. 149 – PP. 78–90.
3. Long S.P., Bernacchi C.J. Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. // *J Exp Bot* – 2003 – Vol. 392 – PP. 2393-2401.

**АНАЛИЗ ВЕГЕТАЦИИ КАРТОФЕЛЯ В ВЕРТИКАЛЬНОЙ ФЕРМЕ С
АВТОМАТИЗИРОВАННЫМ УПРАВЛЕНИЕМ МИКРОКЛИМАТОМ**

**Analysis of potato vegetation process in vertical farm with automated
microclimate control**

Борис Румянцев¹, Виктория Каменчук^{1},
Софья Джатдоева¹, Азрет Кочкаров^{1,2}*

¹Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

²Финансовый университет при Правительстве Российской Федерации

**e-mail: vkamenchuk.sci@bk.ru*

Одним из центральных направлений исследований в области агротехнологий является создание новых методов сокращения периода вегетации выращиваемых сельско-хозяйственных культур с сохранением и, по возможности, увеличением количества и качества получаемого урожая [1]. К основным методам, применяемым для этих целей, можно отнести косвенное воздействие на выращиваемое растение путём управления параметрами окружающей среды [2]. При этом указанный метод, направленный на управление параметрами окружающей среды, труднореализуем в полевых условиях, поэтому, как правило, используется в рамках закрытых от воздействия погодных условий ферм. Помимо повышения урожайности и сокращения полного периода вегетации, выращивание растений в рамках контролируемых условий позволяет тестировать математические модели влияния параметров окружающей среды на процесс вегетации [3].

В данном исследовании проведена диагностика процесса вегетации картофеля сорта «Инноватор», высаженного в виде микрорастений и микроклубней в контролируемых условиях экспериментальной установки ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, проведено сравнение процесса их вегетации с процессом вегетации полевого картофеля. Экспериментальная установка представляет из себя вертикальную ферму, состоящую из стеллажей, имеющих 5 уровней полок, на каждую из которых расположено несколько индивидуальных контейнеров для выращивания растений. Для определения динамики водопотребления использовалась зависимость влажности субстрата от времени, полученная с использованием датчиков влажности почвы, расположенных в контейнерах.

В рамках проведенных исследований установлено, что полный вегетационный период как микроклубней, выращенных в контролируемых условиях, сокращается по сравнению с периодом вегетации полевого картофеля за счёт уменьшения длительности финального этапа вегетации – набора массы новообразованных клубней после их формирования – на 20 суток. В случае микрорастений, пророщенных в контролируемых условиях, сокращение также происходит на 20 суток – за счёт как начального этапа вегетации, так и финального этапа. При этом суммарное количество потребленной воды на этапе формирования новых клубней оказывается одинаковым как для микрорастений, так и для микроклубней, в то время как средняя скорость водопотребления на данном этапе оказывается меньше в случае микрорастений, чем в случае микроклубней [1].

1. Rumiantsev B. et al. Analysis of the Potato Vegetation Stages Based on the Dynamics of Water Consumption in the Closed Urban Vertical Farm with Automated Microclimate Control // *Agronomy*. – 2023. – Т. 13. – №. 4. – С. 954.
2. Молчанов А.Г., Самойленко В.В. Технология регулирования факторов внешней среды растений // *Вестник АПК Ставрополя*. – 2011. – №. 2. – С. 37а-40.
3. Панова Г.Г. и др. Основы физического моделирования «идеальных» агроэкосистем // *Журнал технической физики*. – 2020. – Т. 90. – №. 10. – С. 1633-1639.

**РЕГУЛЯЦИЯ STATE TRANSITIONS ПРИ ПОВЫШЕНИИ ОСВЕЩЕННОСТИ У
*CHLAMYDOMONAS REINHARDTI***

**Regulation of state transitions upon increased illumination in
*Chlamydomonas reinhardtii***

*Ю.С. Рыжих, В.В. Терентьев, Д.В. Ветошкина**

Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное
подразделение ФИЦ Пушинский научный центр биологических
исследований РАН, Пушкино, Россия

*e-mail: vetoshkina_d@mail.ru

Постоянно изменяющиеся условия окружающей среды привели к формированию у фотосинтезирующих организмов различных механизмов адаптации. Механизм кратковременной адаптации - state transitions имеет большое значение в адаптации зеленых водорослей к изменению освещенности. State transitions представляет собой перераспределение светособирающих комплексов (ЛНСII) между двумя фотосистемами. Выделяют 2 состояния: при состоянии 1 ЛНСII связаны исключительно с ФСII, при состоянии 2 подвижные комплексы ЛНСII мигрируют и связываются с ФСI. Белки светособирающей антенны ФС2 фосфорилируются STT7-киназой, что инициирует протекание state transitions.

В данной работе исследовали влияние длительного действия повышенной освещенности на способность клеток микроводоросли *C. reinhardtii* (CC503) осуществлять протекание процесса state transitions. Клетки дикого типа *C. reinhardtii* (CC503) выращивали в автотрофных условиях при температуре 25°C, 5% CO₂, при непрерывном освещении белым светом с интенсивностью света 100 мкмоль квантов м⁻²с⁻¹. Для эксперимента отбирали клетки в экспоненциальной фазе и в течение трех дней адаптировали к повышенной освещенности. Оценку state transitions проводили с помощью измерения низкотемпературной флуоресценции хлорофилла и определения соотношения пиков флуоресценции ФС1/ФС2. Для перевода культуры в состояние 1 использовали освещение дальним красным светом в присутствии 25 мкМ DCMU (3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина), для перевода в состояние 2 клетки микроводорослей освещали ближним красным светом, возбуждающим преимущественно фотосистему 2.

Было показано, что повышение освещенности до 500 мкмоль квантов/м²с приводит к возрастанию соотношения ФС1/ФС2, что может свидетельствовать об увеличении количества антенных комплексов, которые отходят от ФС2, особенно через 48 часов после увеличения освещенности. Не известной остается регуляция такого адаптационного механизма. Известно, что увеличение освещенности приводит к генерации активных форм кислорода и, в частности, пероксида водорода, который является известной сигнальной молекулой. Для изучения влияния пероксида водорода на протекание state transitions H₂O₂ добавляли к культуре клеток и инициировали переход в состояние 2.

Добавка пероксида водорода приводила к значительному увеличению соотношения ФС1/ФС2, такому же, как в условиях повышенной освещенности. Освещение дальним красным светом, после инициации состояния 2 в присутствии пероксида водорода, приводило к снижению соотношения ФС1/ФС2 до значений характерных для клеток, освещенных в отсутствие пероксида водорода.

Таким образом, в данной работе впервые показана инициация отхода части светособирающей антенны ФСII от ФСII в клетках зеленой микроводоросли *C. Reinhardtii* при низкой освещенности, но в присутствии пероксида водорода, схожая с таковой при повышении освещенности.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 22-74-10088.

**ИНДУЦИРОВАННЫЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКИМИ СИГНАЛАМИ СИСТЕМНЫЕ
ОТВЕТЫ ФОТОСИНТЕЗА: ФЕНОМЕНОЛОГИЯ, МНОЖЕСТВЕННЫЕ
МЕХАНИЗМЫ, МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ**

Photosynthetic responses induced by electrical signals: phenomenology, multiple mechanisms, simulation

*Владимир Сухов**, *Екатерина Сухова*

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
Нижний Новгород, 603950, Россия

**e-mail: vssuh@mail.ru, тел. +7 909 2928653*

Действие широкого спектра неблагоприятных факторов имеет пространственно-неоднородный характер, вследствие чего растению необходимы специализированные стрессовые сигналы. Важную роль среди них играют электрические сигналы (ЭС), включая потенциал действия, переменный потенциал и системный потенциал, которые могут индуцировать изменения физиологических процессов в интактных частях растений, включая развитие фотосинтетических ответов. Феноменологический анализ показывает возможность возникновения фотосинтетических ответов с различной направленностью и динамикой, что требует объяснения механизмов многообразия вызванных ЭС изменений фотосинтеза.

Использование принципа «узкого места» позволяет объяснить такие феноменологические результаты. Известно, что ЭС могут вызывать быстрое закрытие или открытие устьиц (в зависимости от условий окружающей среды и состояния растений), снижение проводимости мезофилла для CO_2 и подавление темновой стадии фотосинтеза, а также – непосредственное угнетение световой стадии фотосинтеза, включая снижение нециклического потока электронов и стимуляцию циклического потока и NPQ. Можно ожидать, что в условиях лимитирования фотосинтеза каждым из этих процессов, его изменения будут оказывать решающее влияние на итоговый фотосинтетический ответ; напротив, если процесс не является лимитирующим, такое влияние будет ограниченным.

Существует ряд аргументов в пользу предложенной гипотезы. В частности, показано, что ЭС-индуцированная активация фотосинтеза тесно связана с открытием устьиц, в то время как инактивация может быть как зависящей, так и независимой от изменения открытости устьиц. Имеются также отдельные работы, которые показывают, что изменения вызванных ЭС ответов световой стадии фотосинтеза могут не влиять на

газообмен растений; в то же время, другие работы показывают значительную корреляцию между изменениями параметров световой и темновой стадии фотосинтеза.

Гипотеза о том, что различие в лимитирующих фотосинтез стадиях у конкретных видов растений в конкретных условиях определяет различие вызванных ЭС фотосинтетических ответов, требует развития комплексных математических моделей фотосинтеза, учитывающих транспорт CO_2 в лист и в клетки, распределение освещения в толще листа, влияние температуры на процессы световой и темновой стадии, регуляцию устьиц и другие процессы. Наши результаты и литературные данные показывают, что подобные модели могут опираться на модифицированные классические подходы, включая оптическую модель Kubelka-Munk, модель ассимиляции CO_2 Farquhar-von Caemmerer-Berry, описание потоков CO_2 на основании метода эквивалентных схем и другие. Анализ комплексных фотосинтетических моделей позволяет выявить влияние изменений конкретных параметров в зависимости от особенностей протекания фотосинтетических процессов. В дальнейшем, подобные модели могут быть объединены с моделями ЭС, что позволит получить инструмент для прогнозирования вызванных электрическими сигналами фотосинтетических ответов в различных условиях.

Работа была поддержана Российским научным фондом (грант № 23-14-00127).

**ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗНИКНОВЕНИЯ НЕОДНОРОДНОСТИ
ИНТЕНСИВНОСТИ ФОТОСИНТЕЗА ПО ПОВЕРХНОСТИ ЛИСТА РАСТЕНИЯ**

**Theoretical study of the heterogeneity of photosynthetic rate over the surface
of a plant leaf**

*Екатерина Сухова**, *Дарья Ратницына*, *Владимир Сухов*

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23

*e-mail: n.catherine@inbox.ru, тел. +7 929 0402938

Фотосинтез является одним из ключевых процессов в жизни растений. Интенсивность фотосинтеза зависит от действия многочисленных факторов среды; можно ожидать, что изменения фотосинтетических процессов будут неоднородны в пространстве. Наша работа посвящена теоретическому анализу возникновения такой неоднородности.

Нами была разработана математическая модель фотосинтетически активного листа растения. Лист состоял из двумерной системы, связанных через апопласт клеток. Для листа в целом описывался газообмен, транспорт CO_2 и ионов по апопласту и через биологические мембраны. Кроме того, для каждой клетки описывалась ассимиляция углекислого газа на основе модели Farquhar–von Caemmerer–Berry и дыхание, а также буферные свойства сред для ионов и CO_2 . Модель решалась численно, методом Эйлера.

Для экспериментальной верификации модели использовали 2-3-недельные растения гороха. Пространственный анализ активности фотосинтетических процессов проводили с использованием Imaging-PAM-M и GFS-3000. На основании полученных измерений рассчитывали нециклический поток электронов. Дополнительно, было показано, что нециклический поток электронов и ассимиляция были связаны линейно при освещении листа светом интенсивностью менее $500 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ [1]; это позволило использовать пространственное распределение потока электронов для оценки пространственного распределения интенсивности ассимиляции CO_2 .

При верификации модели наблюдалось хорошее соответствие с экспериментальными данными; в частности, скорость ассимиляции возрастала при увеличении интенсивности света и падала при снижении проводимости устьиц.

Анализ модели показал, что неоднородность фотосинтетической ассимиляции CO_2 усиливалась при увеличении интенсивности освещения и при закрытии части устьиц [1]. Результаты моделирования хорошо согласуются с экспериментальным увеличением неоднородности ассимиляции при усилении освещения и развитии водного дефицита [1].

Дополнительно была проверена гипотеза о влиянии изменений активности H^+ -АТФазы и связанных сдвигов соотношения CO_2 и HCO_3^- на скорость ассимиляции CO_2 . Модель показала, что изменение активности H^+ -АТФазы слабо влияло на скорость ассимиляции; однако, изменение проводимости плазматической мембраны и оболочек хлоропластов для CO_2 значительно модифицировало скорость ассимиляции [2]. Следовательно, наиболее важным для ассимиляции является активность транспорта CO_2 через биологические мембраны; перенос может осуществляться через аквапорины.

Работа была поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований (грант № 20-34-90086 Аспиранты)

1. Sukhova E., Ratnitsyna D., Gromova E., Sukhov V. Development of two-dimensional model of photosynthesis in plant leaves and analysis of induction of spatial heterogeneity of CO_2 assimilation rate under action of excess light and drought. *Plants* 2022, 11, 3285.
2. Sukhova E., Ratnitsyna D., Sukhov V. Simulated analysis of influence of changes in H^+ -ATPase activity and membrane CO_2 conductance on parameters of photosynthetic assimilation in leaves. *Plants* 2022, 11, 3435.

**ПОЛУЧЕНИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОЙ
КАРБОАНГИДРАЗЫ САНЗ ИЗ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII***

**Production and biochemical properties of the recombinant carbonic anhydrase
САНЗ from *Chlamydomonas reinhardtii***

Василий Терентьев^{1*}, *Любовь Трубицина*², *Анна Шукшина*¹,
*Иван Трубицин*², *Наталья Руденко*¹

¹ИФПБ РАН, Пушкино

²ИБФМ РАН, Пушкино

*e-mail: v.v.terentyev@gmail.com

Фотосистема 2 (ФС2) является самым уязвимым компонентом фотосинтетического аппарата тилакоидной мембраны. Одним из наиболее значимых ингибирующих факторов для ФС2 выступает снижение значения люменального рН, при этом локальное закисление активного центра водоокисляющего комплекса (ВОК) может не только подавлять его функцию, но и приводить к выпадению атомов Mn (Shutova et al., 2008). В нескольких работах (Shutova et al., 2008, Terentyev et al., 2019,2020) было показано, что карбоангидраза (КА) САНЗ участвует в поддержании высокой активности ФС2 *C. reinhardtii*, по-видимому, за счет стимулирования отвода Н⁺ от активного центра ВОК.

В ходе выполнения проекта часть гена *cah3*, кодирующая каталитическую часть фермента, была клонирована в несколько векторов из серий рQE, рЕТ, рЕТ-32а и экспрессирована в гетерологичной системе – в штамме *E. coli*. Наиболее удачной, с наибольшим выходом продукта, оказалась конструкция с использованием вектора рЕТ. Отработка схемы очистки позволила получать до 8 мг высокоактивного рекомбинантного белка с литра среды. Для предотвращения агрегации белка и выпадения его в осадок использовались высокие концентрации NaCl в диапазоне 0,25–0,75 М. Наибольший выход белка наблюдался при 0,75 М NaCl, однако изучение КА-активности белка показало, что наиболее оптимальным является 0,5 М NaCl, при котором значение активности достигало ~7000 WAU мг⁻¹ белка, в то время как при 0,75 М NaCl ~5000 WAU мг⁻¹ белка (~70%). Изучение выявило сильную рН-устойчивость фермента с плато в диапазоне значений от 6 до 8 и со снижением активности при рН 5 (~85%), 9 (~93%) и 10 (~76%). После инкубации фермента при +4 °С в течение 3 дней максимальная КА-активность при рН 9,0 оставалась высокой (~81% от изначальной), а наибольшая потеря

наблюдалась при pH 6 и 5 (~67%). Половина активности фермента при его термоинактивации терялась при 30 °С, однако вплоть до 60 °С сохранялась на уровне 25%.

Огромную роль в активности фермента играет единственный S-S мостик между двумя цистеинами (C90 и C258). Восстановление этих S-групп полностью ингибирует КА-активность САНЗ (Benlloch et al., 2015). Изучение различных восстановителей для S-групп показало, что наибольшим ингибирующим эффектом обладает цистеин. Полное подавление наблюдается при 2 мМ (50% при 0,7 мМ). Дитиотреитол полностью подавлял активность при 30 мМ (50% при 7,5 мМ), в то время как 2-меркаптоэтанол при 70 мМ (0,5%) (50% при 18 мМ). Инкубация белка с агентами в течение 10 мин не усиливало подавляющий эффект. Также не усиливало подавляющий эффект инкубация белка с дитиотреитолом при pH 7,0, хотя известно о сильной pH-зависимости его S-восстанавливающих свойств.

Таким образом, полученный рекомбинантный белок САНЗ имеет высокую КА-активность устойчивую в широком диапазоне pH и зависящую от наличия единственной S-S-связи в молекуле.

Работа выполнена за счет гранта РФФ № 23-24-00550

1. Shutova et al., 2008, EMBO J
2. Terentyev et al., 2019, BBA
3. Terentyev et al., 2020, Life
4. Benlloch et al., 2015, Plant Physiol

**ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА БЕТА КАРБОАНГИДРАЗЫ 5 ИЗ
*ARABIDOPSIS THALIANA***

**Localization and characterization of beta carbonic anhydrase 5
from *Arabidopsis thaliana***

Татьяна Хорошаева^{1*}, Роман Маркин¹, Любовь Трубицина²,
Иван Трубицин², Инга Киреева³,
Наталья Руденко¹, Азам Абдуллатыпов¹

¹Институт Фундаментальных Проблем Биологии Российской академии наук (ИФПБ РАН)

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН)

³University of Toronto, Toronto ON Canada

*e-mail: fedor4uk.t@gmail.com, телефон +7 918 3171360

Реакцию обратимого превращения бикарбонат-иона в углекислый газ (CO₂) в живых организмах катализирует карбоангидраза (КА). Геном *Arabidopsis thaliana* содержит девятнадцать генов, кодирующих КА, принадлежащих к трем различным семействам, однако, местоположение и функции большинства из них до сих пор не идентифицированы. Как правило, КА растений взаимозаменяемы, что хорошо прослеживается для карбоангидразной системы хлоропластов, где удаление одной из шести имеющихся там КА не влияет, а в некоторых случаях даже улучшает внешний вид растения. Исключением является бета-КА5 [1], без которой растения не могут расти при текущей концентрации CO₂ в атмосфере (ок. 400 ppm). Мутанты с отсутствующей бета-КА5 могут существовать только при повышенной концентрации CO₂ в воздухе (ок. 1000 ppm), при этом их метаболизм значительно снижен. По всей видимости, бета-КА5 является звеном ключевого метаболического пути, и ее удаление влияет на жизнеспособность всего растительного организма в целом. Ряд исследователей находит данную КА в строме [2], но требуются более серьезные доказательства в пользу этого утверждения.

В представленной работе при помощи масс-спектрометрии были получены убедительные доказательства того, что в люмене тилакоидов [3] находятся пять уникальных пептидов, указывающих на наличие в этом компартменте бета-КА5. Для характеристики белка использовали очищенную рекомбинантную бета-КА5. Полученный фермент являлся термически нестабильным. Его активность стимулировалась дитиотреитолом, что характерно для КА, принадлежащих бета-семейству.

На основании аминокислотного состава рекомбинантной Бета-КА5 был предсказан рН-оптимум близкий к 9.0, что коррелирует с экспериментальными данными.

На основе компьютерного моделирования связывания фермент-лиганд, проводившегося в программе Autodock Vina, для Бета-КА5 были предсказаны константы ингибирования гидрофильным ингибитором КА, мафенидом, и гидрофобным – этоксизоламидом. Экспериментально полученные данные коррелируют с предсказанными и указывают на то, что константа ингибирования этоксизоламидом меньше константы ингибирования мафенидом. Полученный результат показывает потенциальную применимость данного подхода для поиска потенциальных ингибиторов КА.

1. Fabre, N., I.M. Reiter, N. Becuwe-Linka, B. Genty, D. Rumeau. 'Characterization and Expression Analysis of Genes Encoding Alfa- and Beta Carbonic Anhydrases in Arabidopsis'. *Plant, Cell and Environment* 30, no. 5 (May 2007): 617–29.
2. Sharma, N., Froehlich, J.E., Rillema, R., Raba, D.A., Chambers, T., Kerfeld, C.A., Kramer, D.M., Walker, B. and Brandizzi, F. (2023) Arabidopsis stromal carbonic anhydrases exhibit non-overlapping roles in photosynthetic efficiency and development. *Plant J.*, *tpj.16231*.
3. Fedorchuk T, Rudenko N, Ignatova L, Ivanov B. The presence of soluble carbonic anhydrase in the thylakoid lumen of chloroplasts from Arabidopsis leaves. *J Plant Physiol.* 2014 Jul 1;171(11):903-6.

**КАРБОАНГИДРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ
ФОТОСИСТЕМЫ 2 ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ:
СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ**

**Carbonic anhydrase activity in the functioning of photosystem 2 from higher
plants: the current state of research**

Александр Шитов

Институт фундаментальных проблем биологии РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН,
142290, Московская обл., г. Пущино, Институтская 2

e-mail: aleksshitow@rambler.ru, тел. +7 916 3617197

Фотосистема 2 (ФС-2) – это единственный в природе пигмент-белково-липидный комплекс тилакоидных мембран цианобактерий, хлоропластов растений и водорослей, способный, за счёт окисления воды под действием света, обеспечивать электронами светозависимые стадии фотосинтеза в тилакоидах. Эффективность функционирования ФС-2 фактически определяет продуктивность растений. Поэтому изучение её механизма работы важно как для фундаментальной, так и для прикладной науки.

По результатам работ (начиная с 50-х годов XX века) показано, что наличие ионов бикарбоната (БК) стимулирует фотосинтетические реакции в ФС-2 (т.н. «БК эффект»). В связи с этим, в 1983 г., А. Стемлер и П. Юрсиник предположили важную роль ускорения преобразований БК (т.н. карбоангидразной активности (КА активности)) в функционировании ФС-2. Действительно, во многих исследованиях позднее было установлено, что субхлоропластные препараты, обогащённые ФС-2 (выделенные из гороха, шпината, пшеницы, арабидопсиса, кукурузы, некоторых цианобактерий и одноклеточных зелёных водорослей) способны ускорять преобразования БК. Однако, главная проблема проводившихся исследований - удавалось регистрировать относительно низкую КА активность препаратов ФС-2. Это могло быть из-за: 1) примесей посторонних КАЗ в полученных препаратах, 2) недостаточной чувствительности использовавшихся методов, что, в целом, ставило под сомнение взаимосвязь КА и фотосинтетической активностей в ФС-2, предполагавшуюся А. Стемлером и П. Юрсиником.

В наших работах были получены доказательства необходимости КА активности для проявления максимальной фотосинтетической активности ФС-2. В недавних работах (готовятся к публикации) мы доказали принципиальную возможность регистрации высокой (в ~10 раз выше, чем

в предыдущих работах) КА активности в ФС-2, используя новый метод измерений. В этих же работах мы доказали, что такая высокая активность не связана с примесями других КАЗ, обнаружив уникальную зависимость активности от рН, а также продемонстрировав это рядом других подходов. Таким образом, высокая КА активность ФС-2, должна выполнять важную функцию в работе фотосистемы.

В настоящий момент, эта функция не вполне ясна. Было показано, что БК может быть нужен для отведения H^+ (как акцептор H^+), выделяющихся в процессе окисления воды в водоокисляющем комплексе ФС-2. КА активность может быть нужна для ускорения отведения H^+ . Нами получены данные, подтверждающие эту гипотезу. Однако, этот вопрос необходимо исследовать глубже.

Очень сложен вопрос с расположением активного центра КА в ФС-2. В ряде работ предполагалось наличие 2-х КАЗ в ФС-2, в одной из наших работ – 4-х. Некоторые выделяют т.н. «внешнюю» КА активность, связанную с низкомолекулярными белками, и т.н. «внутреннюю», связанную с ядром ФС-2 («коровым» комплексом). Данные по этому вопросу весьма неполные и часто противоречивые (например, в связи с КА активностью белка PsbO), что требует дополнительных всесторонних исследований. Таким образом, выяснение функции КА активности, определение её носителя(лей) открывает большие перспективы для исследований механизма функционирования ФС-2.

**ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА САНЗ НА УСТОЙЧИВОСТЬ
ФОТОСИСТЕМЫ 2 ИЗ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* К ФОТО- И
ТЕРМОИНАКТИВАЦИИ**

Effect of recombinant SAN3 protein on photosystem 2 of *Chlamydomonas reinhardtii* resistance to photo- and thermal inactivation

*Анна Шушкина**, *Василий Терентьев*

ИФПБ РАН, Пущино

*e-mail: sshukshinka@gmail.com

Карбоангидразы (КА) – это широко распространенные в природе ферменты, катализирующие обратимую реакцию гидратации CO₂. Они вовлечены во многие метаболические процессы практически во всех живых организмах. Предполагается их возможное участие и в работе фотосистемы 2 (ФС2). α-КА САНЗ из зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* является на сегодняшний день единственной идентифицированной КА, которая ассоциирована с пигмент-белковым комплексом ФС2.

В данной работе мы исследовали влияние рекомбинантного белка САНЗ на устойчивость ФС2 из *C. reinhardtii* к термоинактивации и фотоинактивации. В качестве объектов исследования были использованы мембранные частицы, обогащенные ФС2, изолированные как из дикого типа (ДТ) *C. reinhardtii*, так и из мутанта *cia3*, с отсутствующей КА САНЗ в люмене тилакоидов.

Изучение фотоинактивации ФС2 в препаратах из ДТ и мутанта *cia3* проводили при непрерывном воздействии красным светом интенсивностью 1200 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹ в термостатированной ячейке (25 °С). ФС2 из *cia3* характеризовались большей скоростью потери O₂-выделяющей активности: время полуспада кривой составляло около 30 и 20 мин у ДТ и *cia3*, соответственно. Через 60 мин освещения препараты ФС2 из ДТ сохраняли ~20% O₂-выделяющей активности, а препараты ФС2 из *cia3* только ~10%. Добавление рекомбинантного белка САНЗ к препаратам ФС2 из мутанта *cia3* перед длительным воздействием светом увеличивало скорость выделения O₂ на 10-15 %, что практически достигало скорости выделения O₂ при фотоинактивации препаратов ФС2 из ДТ. Инкубирование препаратов в темноте при 25 °С также выявило разницу в потере O₂-выделяющей активности между ФС2 из ДТ и *cia3*: у ДТ потеря 50% активности происходила за ~40 мин, а у *cia3* – за ~30 мин. Повышение температуры при инкубации препаратов в темноте показала

меньшую стабильность водоокисляющего комплекса (ВОК) в ФС2 из *cia3*. Так, при 40 °С потеря 50% O₂-выделяющей активности отмечалась у ДТ за ~10 мин, а у мутанта *cia3* за ~5 мин, т.е. скорость термоинактивации ФС2 из *cia3* была в 2 раза выше. При этом через 60 мин инкубации в темноте при 40 °С наблюдалось сохранение небольшой O₂-выделяющей активности препаратами ФС2 из ДТ, а у препаратов ФС2 из *cia3* отмечалось фотоиндуцированное поглощение O₂, свидетельствующее о разрушении ВОК и частичном удалении Mn₄CaO₅-кластера.

Таким образом, отсутствие белка САНЗ может вызывать дестабилизацию белкового комплекса ВОК, в результате чего длительное воздействие света и повышенной температуры приводит к более сильному ингибированию O₂-выделяющей активности ФС2 или даже поглощению O₂. В поддержание данного предположения выступает то, что добавление активного рекомбинантного белка САНЗ к препаратам ФС2 из мутанта *cia3* стимулирует скорость выделения O₂ до уровня, наблюдаемого в препаратах ФС2 из ДТ при действии стрессовых факторов.

Работа выполнена за счет гранта РФФ № 23-24-00550.

Секция 3. ФОТОРЕЦЕПЦИЯ

ГИБРИДНЫЕ БЕЛКИ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ НАПРАВЛЕННУЮ ОРИЕНТАЦИЮ РЕТИНАЛЬНОГО БЕЛКА В ПРОТЕОЛИПОСОМАХ

Hybrid proteins determining oriented insertion of a retinal protein in proteoliposomes

В.А. Большаков^{1,2}, Л.Е. Петровская¹, Е.А. Крюкова¹,
Е.П. Лукашев², С.А. Силецкий³

¹Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Биологический факультет, 119234, Москва, Россия

³НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, Московский государственный
университет им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Россия

e-mail: lpetr65@yahoo.com

ESR – ретинальный белок *Exiguobacterium sibiricum*, содержащий остаток лизина в качестве донора протонов для основания Шиффа [1-3]. Для разработки методов получения протеолипосом с одинаково ориентированными молекулами белка сконструированы гибриды ESR с различными растворимыми белками. В качестве С-концевых партнеров использовали флуоресцентный белок mCherry и тиоредоксин *E. coli* (Trx), а в качестве N-концевых – молекулярный шаперон Caf1M и мальто-связывающий белок (MBP). Определение параметров фотоцикла и электрогенного переноса зарядов через мембрану показало, что для гибридов ESR-Cherry и ESR-Trx характерно существенное уменьшение относительных амплитуд электрогенных фаз, связанных с репротонированием основания Шиффа, и присутствие фаз с отрицательным вкладом, что указывает на пониженную эффективность транспорта протонов. Напротив, гибрид Caf-ESR продемонстрировал кинетику светоиндуцированных электрогенных реакций, сходную с диким типом. Предположительно, причиной снижения эффективности С-концевых гибридов является присутствие в протеолипосомах молекул, имеющих противоположную ориентацию. Использование N-концевого гибрида с Caf1M обеспечивает единообразное встраивание ESR в липидный бислой и, как следствие, высокую эффективность

трансмембранного переноса протонов [4]. Результаты работы могут быть использованы для направленного встраивания различных мембранных белков в протеолипосомы с целью их функциональных исследований и биотехнологического применения.

Работа проводится при финансовой поддержке гранта РФФ № 22-14-00104.

1. Balashov S.P. et al. *J. Biol. Chem.*, 2013, 288, 21254-21265.
2. Siletsky S.A. et al. *BBA-Bioenergetics*, 2016, 1741-1750.
3. Siletsky S.A. et al. *BBA-Bioenergetics*, 2019, 1860, 1-11.
4. Petrovskaya L.E. et al. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, 24(8), 7369.

**ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ОСНОВ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИИ
ЦИАНОБАКТЕРИЙ К ИЗМЕНЕНИЮ ИНТЕНСИВНОСТИ СВЕТА**

**Investigation of the Molecular Basis of Light Intensity Adaptation
in Cyanobacteria**

Антонина Буханько^{1}, Георгий Цораев¹, Глеб Будылин²,
Евгений Ширишин², Юрий Слонимский³, Николай Случанко³,
Дмитрий Черепанов⁴, Ярослава Шакина⁵,
Андрей Рубин¹, Евгений Максимов¹*

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Биологический факультет, Москва, Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Физический факультет, Москва, Россия

³Институт биохимии имени А.Н. Баха,

Государственный исследовательский центр биотехнологии
Российской академии наук, Москва, Россия

⁴Государственный исследовательский центр химической физики имени
Н.Н. Семенова, Российская академия наук, Москва, Россия

⁵Московский политехнический университет, Москва, Россия

**e-mail: tehnanana@mail.ru, тел. +7 902 9703614*

ОСР (orange carotenoid protein) – фотоактивный каротиноид-содержащий белок, осуществляющий в клетках цианобактерий процесс нефотохимического тушения возбужденных состояний пигментов светособирающих комплексов. Белок становится физиологически активным после поглощения интенсивного света сине-зеленой области спектра за счет конформационных изменений белковой матрицы и открытия сайта связывания с антенной. За счет этих изменений раствор белка приобретает красный цвет. Красная форма белка способна самопроизвольно релаксировать в исходное состояние, но данный процесс занимает время более 10 секунд. Для эффективной адаптации к быстрым изменениям интенсивности света цианобактерии используют регуляторный белок FRP (fluorescence recovery protein), в присутствии которого релаксация красной формы ОСР ускоряется примерно на два порядка.

Из-за низкой эффективности фотоконверсии ОСР, при изучении механизма взаимодействия белков ОСР и FRP долгое время использовали

вспышки большой длительности, что не позволяло увидеть короткоживущие переходные состояния фотоцикла ОСР. В связи с этим фотоцикл ОСР остается мало изучен. Особенностью метода, использованного в нашей работе, является использование коротких вспышек большой интенсивности. Используемый метод позволил установить три новых переходных состояния фотоцикла и связать их со структурными изменениями белковой матрицы ОСР. В результате нами предложена схема фотоцикла ОСР, учитывающая особенности взаимодействия ОСР и FRP.

ФОТОАКТИВАЦИЯ И РАДИАЦИОННЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДОМЕНОВ LOV

Photoactivation and radiation damage of LOV domains

И.Ю. Гушчин¹, А.А. Ремеева¹, О.Ю. Семенов¹, К.В. Ковалев²*

¹Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

²Европейская лаборатория молекулярной биологии,
Гамбург, Германия

*e-mail: ivan.gushchin@phystech.edu, тел. +7 965 4282224

Домены LOV – это широко распространенные фоторецепторные модули, которые были обнаружены в белках растений, грибов, протистов, архей и бактерий [1,2]. При поглощении доменом LOV фотона синего света, его хромофор (флавин) переходит в возбужденное состояние и позже образует ковалентную связь с сохраняющимся цистеином белка [2]. Считается, что следующим событием в дальнейшей передаче сигнала является переориентация («флип») близлежащей боковой цепи глутамина; вместо водородной связи между атомом N_{ε2} глутамина и O4 флавина образуется водородная связь между атомом O_{ε1} глутамина и протонированным атомом N5 флавина [2]. Мы показываем при помощи рентгеновской кристаллографии, что недавно описанный домен LOV гибридной гистидин-киназы Cag_g_3753 из бактерии *Chloroflexus aggregans* (CagLOV) [3] имеет иной механизм передачи сигнала: в фотоактивированном состоянии сохраняющийся глутамин 148 не теряет водородной связи с атомом O4 флавина, но при этом удаляется от атома N5 флавина. Более того, мы показываем, что облучение CagLOV рентгеновскими лучами приводит к структурным перестроениям, похожим на наблюдаемые при фотоактивации. Полученные данные позволяют сформулировать обобщенную модель фотоактивации и радиационных повреждений доменов LOV.

Работа была поддержана Российским научным фондом (грант № 21-64-00018).

1. Glantz S.T., Carpenter E.J., Melkonian M. et al. Chow, Functional and topological diversity of LOV domain photoreceptors, PNAS. 113 (2016) E1442–E1451. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509428113>.
2. Losi A., Gärtner W., Solving Blue Light Riddles: New Lessons from Flavin-binding LOV Photoreceptors, Photochemistry and Photobiology. 93 (2017) 141–158. <https://doi.org/10.1111/php.12674>.
3. Nazarenko V.V., Remeeva A., Yudenko A. et al. A thermostable flavin-based fluorescent protein from *Chloroflexus aggregans*: a framework for ultra-high resolution structural studies, Photochem. Photobiol. Sci. 18 (2019) 1793–1805. <https://doi.org/10.1039/c9pp00067d>.

**СВЕТО-ИНДУЦИРОВАННАЯ ГЕНЕРАЦИЯ РАДИКАЛОВ СУПЕРОКСИДА
ПРОДУКТАМИ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ДЕСТРУКЦИИ МЕЛАНОСОМ ИЗ КЛЕТОК
РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА**

А.Е. Донцов, М.А. Яковлева, М.А. Островский*

Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля, Москва, РФ

**e-mail: lina.invers@gmail.com, тел. +7 929 5707301*

Известно, что при старении происходит значительное снижение концентрации меланина в клетках ретинального пигментного эпителия (РПЭ) глаза человека [1], обусловленное, вероятно, (фото)окислительной деструкцией пигмента с образованием низкомолекулярных флуоресцирующих продуктов [1,2]. Ранее нами было показано, что продукты окислительной деструкции меланина содержат реактивные карбонилы, способные модифицировать белки в результате образования оснований Шиффа с свободными аминогруппами [3]. В настоящем исследовании показано, что продукты окислительного распада меланосом из клеток РПЭ глаза человека фоточувствительны и изменяют свои флуоресцентные свойства при облучении видимым светом. Впервые обнаружено, что водорастворимые продукты окислительного распада РПЭ меланосом способны к свето-зависимой генерации супероксидных радикалов. Установлено, что при облучении синим светом с максимумом поглощения при 450 нм, продукты окислительной деструкции РПЭ меланосом восстанавливают цитохром *c* и нитросинийтетразолий, причем этот процесс ингибируется супероксиддисмутазой. Исследована зависимость скорости образования супероксидных радикалов от интенсивности и длины волны облучения. Предполагается, что продукты деструкции меланина меланосом фототоксичны для клеток РПЭ и могут усиливать развитие старческих дегенеративных болезней глаза.

Литература.

1. Sarna T., Burke J.M., Korytowski W., Rózanowska M., Skumatz C.M.B., Zareba A., Zareba M. Loss of melanin from human RPE with aging: possible role of melanin photooxidation, *Experimental Eye Research*. 76 (2003) 89–98.
2. Dontsov A.E., Sakina N.L., Ostrovsky M.A. Loss of melanin by eye retinal pigment epithelium cells is associated with its oxidative destruction in melanolipofuscin granules *Biochemistry (Moscow)*, 82 (2017) 916–924.
3. Gulina A. A., Dontsov A. E., Yakovleva M. A., Trofimova N. N., Aybush A. V., Vasin A. A., Ostrovsky M. A. Oxidative destruction of human RPE melanosomes induced by superoxide radicals lead to the formation of reactive aldehydes and ketones, *St. Petersburg State Polytechnical University Journal. Physics and Mathematics*. 15 (3.2) (2022) 311–316. DOI: <https://doi.org/10.18721/JPM.153.257>

**МУТАЦИИ В МОЛЕКУЛЕ ФИТОХРОМА А ВЛИЯЮТ НА БИОСИНТЕЗ
ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ПРОТОХЛОРОФИЛЛА В ЭТИОЛИРОВАННЫХ
РАСТЕНИЯХ ARABIDOPSIS**

**Mutations in phytochrome A molecule promote changes in the protochlorophyll
biosynthesis in etiolated Arabidopsis plants**

Л.А. Коппель^{1}, О.Б. Беляева¹, С. Bolle², В.А. Синещёков¹*

¹Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

²Biology Department, Ludwig Maximilian University, München, Germany

**e-mail: koppelar@gmail.com*

Фитохром А (phyA) является одним из ключевых фоторецепторов, контролирующих прорастание семян [1] и переход растений от ското- к фотоморфогенезу [2]. Он подавляет или стимулирует, в зависимости от вида и органа/ткани растения и световых условий, накопление активного и неактивного протохлорфиллидо (Пхд655 и Пхд633) [3]. Сложная регуляторика с участием phyA связана с существованием двух его форм (phyA' и phyA'') осуществляющих различные типы фотоответов [2]. В данной работе обнаружен и исследован новый эффект с участием фитохрома А – стимуляция накопления Пхд в этиолированных проростках Arabidopsis, выращенных из предосвещенных белым светом семян.

1. Casal, J. J., Sánchez, R. A. (1998). Seed Science Research, 8(3), 317-329.
2. Sineshchekov, V., Koppel (2022). Biophysical Reviews, 14(4), 905-921.
3. Синещёков, В. А., Беляева, О. Б. (2019). Биохимия, 84(5), 648-667.

ФОТОРЕЦЕПЦИЯ В НОСИТЕЛЯХ ГЕНОВ РОДОПСИНОВ С МОТИВОМ DTG/DTS

Photoreception in DTG/DTS motif rhodopsin genes hosts

*Анатолий Михайлов**, Сергей Бухалович,
Даниил Сидоров, Валентин Горделий

Лаборатория перспективных исследований мембранных белков,
Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных
заболеваний, МФТИ

*e-mail: tlja.mikhajlv@gmail.com, тел. +7 999 1998923

Родопсины – связывающие ретиналь фотоактивные мембранные белки, широко представленные в царствах живого: в бактериях, археях и эукариотах. В нашей работе мы рассмотрели два белка, принадлежащие к филогенетической кладе с уникальным мотивом DTG/DTS. Это бактериородопсин из *Sphingomonas paucimobilis* (SpaR) [1] и бактериородопсин из *Pseudomonas putida* (PspR). Светоиндуцированное снижение рН и ингибирование этого процесса при помощи карбонилцианида-*м*-хлорфенилгидразона указывает на функционирование этих белков как светозависимых протонных насосов, качающих наружу. Работы наших коллег подтверждают наши результаты [2].

Однако, остается открытым вопрос участия этих родопсинов в фоторецепции и наличие в метаболизме организмов-носителей необходимого кофактора – ретиналя. В поисках ответа, мы рассмотрели доступные метаболические карты *Sphingomonas paucimobilis* и *Pseudomonas putida*, а также организмов-носителей филогенетически родственных белков, найденных ранее. Рассматривали *Pantoea vagans*, *Asaia platycodi*, *Sphingomonas rubra* и *Pseudomonas fulva*. Учитывали наличие в геноме родопсинов, ферментов метаболизма каротиноидов, в частности β-каротин-15,15'-диоксигеназы, катализирующую получение ретиналя. Дополнительно было выявлено, что эти организмы часто являются фитопатогенами или оппортунистическими патогенами, вызывающими внутрибольничные инфекции [3].

По результатам поиска можно сделать выводы: не у всех организмов-носителей есть возможность самостоятельно синтезировать β-каротин, происхождение ретиналя в организмах-носителях родопсинов с DTG/DTS мотивом остается неизвестным.



Работа была поддержана фондом РФФ, грант № 21-64-00018.

1. Maliar N. и др. Novel pH-Sensitive Microbial Rhodopsin from *Sphingomonas paucimobilis* // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2020. V. 495. No 1. P. 342–346.
2. Okhrimenko I.S. et al. Mirror proteorhodopsins // *Commun. Chem.* 2023. V. 6. No 1. P. 88.
3. Sudo Y., Yoshizawa S. Functional and Photochemical Characterization of a Light-Driven Proton Pump from the Gammaproteobacterium *Pantoea vagans* // *Photochem. Photobiol.* 2016. V. 92. No 3. P. 420–427.

ФОТОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ДИМЕРОВ ХЛОРОФИЛЛА В БЕЛКАХ СЕМЕЙСТВА WSCP

Photochemical activity of chlorophyll dimers harbored by Water Soluble Chlorophyll-binding Proteins

К.В. Неверов^{1,2}, Ю.Н. Обухов^{1,2}, Ю.В. Малеева²*

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва

²Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

**e-mail: neverovk@mail.ru, тел. 8 903 1004034*

Водорастворимые хлорофилл-связывающие белки семейства WSCP (*Water Soluble Chlorophyll-binding Proteins*) высших растений, в отличие от пигмент-белковых комплексов фотосинтетического аппарата, локализованы в клетке вне мембранных структур хлоропластов и не участвуют в фотосинтезе. Холоформы WSCP образуются при связывании апобелков с хлорофиллом (Хл); они имеют тетрамерную структуру ($M_r \sim 75 - 80$ kDa) и связывают до четырех молекул Хл [1].

Молекулы Хл в WSCP упакованы в виде двух димеров, аналогичных димерам «специальной пары» Хл в реакционных центрах (РЦ) фотосистем. Поскольку именно «специальная пара» Хл (БХл) в РЦ играет роль донора электрона в первичном фотохимическом акте, возникает вопрос о возможности фотохимической активности у конвергентно сходных димеров Хл в составе WSCP.

В данной работе мы исследовали взаимодействие собранных *in vitro* холоформ WSCP с донорами и акцепторами электрона при облучении их растворов красным светом, поглощаемым только Хл. В качестве объектов были выбраны белки W_0 WSCP и L_v WSCP – представители подклассов семейства WSCP IIa (связывают только Хл *a*) и IIb (связывают помимо Хл *a* до 30% Хл *b*), соответственно.

Облучение красным светом ($\lambda \geq 650$ нм) WSCP в присутствии цитохрома *c* в бескислородной среде приводило к восстановлению цитохрома, детектируемому по приросту его пика поглощения при 550 нм. Константа скорости фотовосстановления цитохрома *c* линейно зависела от его концентрации. Установлено, что источником электрона для восстановления цитохрома в наших экспериментах служил Трис (трис(гидроксиметил)аминометан), присутствовавший в пробах в качестве буферного основания [2].

При облучении насыщенных воздухом растворов WSCP наблюдалось окисление доноров электрона - НАДН или аскорбата. В бескислородной среде фотоокисление доноров не происходило. Снижение скорости фотоокисления доноров при добавлении NaN_3 – тушителя триплетного состояния Хл и синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$), указывает на протекание реакции по механизму типа II, через фотогенерацию $^1\text{O}_2$ триплетными димерами Хл. Константа скорости фотоокисления НАДН заметно не отличалась для обоих подклассов WSCP (BoWSCP и (LvWSCP).

В процессе фотоокисления НАДН и аскорбата интенсивность полосы поглощения Хл, а также амплитуда сигнала кругового дихроизма, соответствующего димерам Хл, падали незначительно (до 10% за 15 мин экспозиции). Это указывает на значительную устойчивость как самого Хл в WSCP, так и его димерной структуры к активным формам кислорода. Константа скорости фотоокисления аскорбата была выше, чем НАДН, что коррелирует со значениями констант тушения $^1\text{O}_2$ для этих веществ.

Обнаруженная фотосенсибилизирующая активность димера Хл в составе холобелков WSCP открывает перспективу для установления механизмов фотопротекторной функции белков этого семейства в растительной клетке. Выявление фотохимической редокс-активности у димеров Хл в WSCP служит предпосылкой для конструирования на основе этих белков водорастворимых моделей эволюционных прототипов фотосинтеза, а также разработки новых нанобиосенсоров, искусственных конверторов солнечной энергии и фототерапевтических препаратов.

Работа поддержана фондом РФ (грант № 21-74-20155).

1. Малеева Ю.В., Неверов К.В., Обухов Ю.Н., Крицкий М.С. // *Молекулярная биология*. 2019. Т. 53(6). С. 998-1011.
2. Обухов Ю.Н., Неверов К.В., Малеева Ю.В., Крицкий М.С. // *Доклады РАН. Науки о жизни*. 2023. Т. 509(1). С. 191–195.

**МЕХАНИЗМ РЕПРОТОНИРОВАНИЯ ОСНОВАНИЯ ШИФФА В РЕТИНАЛЬНОМ
БЕЛКЕ *EXIGUOBACTERIUM SIBIRICUM* И ЕГО РОЛЬ В ЭФФЕКТИВНОСТИ
ФОТОИНДУЦИРОВАННОГО ТРАНСПОРТА ПРОТОНОВ**

**Mechanism of reprotonation of the Schiff base in the proteorhodopsin from
Exiguobacterium sibiricum and its role in the efficiency
of light-induced proton transport**

Лада Петровская^{1*}, *Евгений Лукашев*², *Махир Мамедов*³,
*Сергей Силецкий*³, *Сергей Балашов*⁴

¹Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Биологический факультет, 119234, Москва, Россия

³НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, Московский государственный
университет им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Россия

⁴University of California, Irvine, CA92697, USA

*e-mail: lpetr65@yahoo.com

Остаток лизина в положении 96, соответствующем донору протонов, обеспечивает эффективное репротонирование основания Шиффа в ретинальном белке *Exiguobacterium sibiricum* (ESR) [1]. Поглощение протонов на цитоплазматической поверхности белка предшествует репротонированию основания Шиффа, следовательно, Lys96 нейтрален в исходном состоянии ESR и приобретает протон после образования интермедиата М [1]. В большинстве микробных родопсинов функцию донора протонов для основания Шиффа выполняют остатки Asp или Glu.

Установлено, что в результате замены K96A значительно снижается эффективность транспорта протонов в прямом направлении и повышается вклад обратных реакций (перенос протона между Asp85 и основанием Шиффа) [3, 4]. Таким образом, важной функцией Lys96 в молекуле ESR является, помимо непосредственно репротонирования основания Шиффа, еще и предотвращение обратных реакций, снижающих эффективность работы помпы. В мутанте H57N/K96A вклад таких реакций существенно ниже, что указывает на роль остатка His57 в их возникновении [4]. Мутанты по этому остатку демонстрируют повышенную эффективность транспорта при pH < 5, следовательно, Lys96 способен функционировать как эффективный донор протонов и при низких pH.

В отличие от K96A, в мутантах K96D/A47T и K96E, содержащих замену Lys96 карбоксильными остатками, скорости поглощения протона и его переноса на основание Шиффа сопоставимы с белком дикого типа. Таким образом, карбоксильные остатки функционируют как доноры протонов в ESR с эффективностью, сравнимой с эффективностью лизина в случае двойного мутанта и несколько меньшей в K96E. Однако механизм репротонирования в этих белках существенно отличается от характерных для ESR и бактериородопсина [5].

Работа проводится при финансовой поддержке гранта РФФ № 22-14-00104.

1. Balashov S.P., et al. *J. Biol. Chem.*, 2013, 288, 21254-21265.
2. Balashov S.P., et al. *Biochemistry*, 2012, 51, 5748-5762.
3. Siletsky S.A., et al. *BBA-Bioenergetics*, 2019, 1860, 1-11.
4. Siletsky S.A., et al. *BBA-Bioenergetics*, 2021, 1862, 148328.
5. Petrovskaya L.E., et al. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2022, 234, 112529.

**ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ МОДЕЛИ ХРОМОФОРНОГО
ЦЕНТРА БАКТЕРИАЛЬНЫХ РОДОПСИНОВ И ИСКУССТВЕННЫХ
ПИГМЕНТОВ НА ЕГО ОСНОВЕ**

**Study of the spectral properties of the chromophore center model of bacterial
rhodopsins and artificial pigments on its basis**

*Александра Сафинова^{1,3}, Николай Беликов¹,
Лада Петровская², Алексей Лукин³, Ольга Демина¹,
Сергей Варфоломеев¹, Андрей Ходонов^{1*}*

¹ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,
Москва, Россия

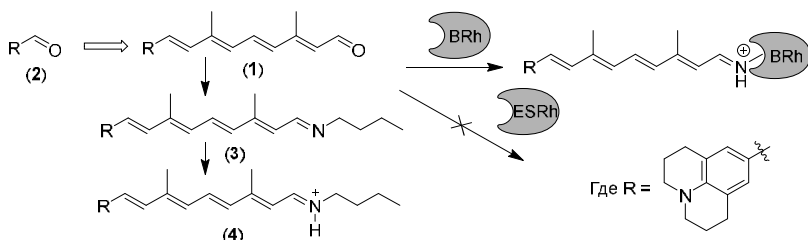
²ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиком
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

³ФГБОУ ВО МИРЕА – Российский технологический университет,
Москва, Россия

**e-mail: khodonov@gmail.com, тел. +7 495 9397148*

Ретиналь-содержащие белки играют ключевую роль в ряде важнейших биологических и физиологических процессов – зрении, росте и дифференцировке тканей, и светозависимом прямом и обратном транспорте протонов и ионов хлора, натрия, в фототаксисе. Цель настоящей работы заключалась в получении аналога ретиналя – (2Е,4Е,6Е,8Е)-3,7-диметил-9-(2,3,6,7-тетрагидро-1Н,5Н-пиридо[3,2,1-ij]хинолин-9-ил)нона-2,4,6,8-тетраеналя (1), модельного основания Шиффа (альдимины) с *n*-бутиламином (3) в изучении процесса его взаимодействия с белками-мишенями (BRh и ESRh) и спектральных характеристик образующихся аналогов бактериальных родопсинов (BRh и ESRh). Замена фрагмента триметилциклогексенового кольца молекулы природного ретиналя на мощный электроно-донорный юлолидиновый заместитель должно оказать сильное влияние на оптические параметры и спектральные свойства целевого альдегида и его модельного альдимины с *n*-бутиламином (3).

Целевой ретиноид (1) был получен из исходного альдегида (2) с общим выходом 19% на исходный альдегид. Индивидуальный *all-E*-изомер ретиноида (1) был выделен с чистотой 98–99% при помощи препаративной ВЭЖХ. Его структура была подтверждена набором физико-химических методов анализа (УФ-, ¹Н-ЯМР-спектроскопией и масс-спектрометрией).



Спектральные свойства полученных препаратов альдегида (1) и альдимины (3), а также их протонированных форм (4) были исследованы при помощи стационарной UV-vis-спектроскопии в диапазоне 250–700 нм в абсолютном метаноле. Обнаружены выраженные различия в спектральном поведении препаратов альдегида (1) и альдимины (3) по сравнению с природным ретиналом и его альдимином.

Было изучено взаимодействие альдегида (1) с препаратами опсинов BRh из *Halobacterium salinarum* и ESRh из *Exiguobacterium sibiricum*. Обнаружено, что альдегид образует искусственный пигмент с бактериоопсином BRh, но не взаимодействует с опсином ESRh. Были исследованы спектральные свойства полученного искусственного аналога бактериородпсина.

Работа частично выполнена в рамках Государственного задания ИБХФ РАН 2022 года (тема №122041300210-2).

МЕХАНИЗМ ОБРАТНОГО ТРАНСПОРТА ПРОТОНА В МИКРОБНЫХ РОДОПСИНАХ

Федор Цыбров^{1}, Кирилл Ковалев², Алексей Алексеев¹,
Виталий Шевченко¹, Сергей Силецкий³, Игорь Чижов⁴,
Александр Кузьмин¹, Иван Гуцин¹, Николай Ильинский¹,
Андрей Рогачев^{1,5}, Валентин Борщевский^{1,5}, Валентин Горделий¹*

¹Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

²Европейская лаборатория молекулярной биологии, Гамбургское отделение DESY, Гамбург, Германия

³Институт Физико-Химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴Институт биофизической химии, Ганновская медицинская школа, Германия

⁵Объединенный институт ядерных исследований, 141980 Дубна, Россия

*e-mail: fedor.tsybrov@phystech.edu, тел. +7 965 1822285

Ретинальные трансмембранные семиспиральные белки – микробные родопсины, являются фоторецептором для многих бактерий, архей и эукариот. Гены микробных родопсинов обнаружены даже в вирусах [1]. Функционально многие микробные родопсины выполняют транспортную функцию, то есть являются либо ионными каналами, либо помпами. Протонная помпа бактериородопсин из *Halobacterium Salinarum* (HsBR) прокачивает протоны из цитоплазмы наружу клетки. Этот микробный родопсин исследуется продолжительное время различными способами: структурными, функциональными, спектральными, биохимическими и другими. На основе результатов многочисленных исследований построена модель механизма транспорта HsBR.

Ксеродопсины, представители микробных родопсинов, прокачивают протон в обратном бактериородопсину направлении, то есть внутрь клетки [2], [3]. До текущего момента опубликована только одна структура ксенородопсина (архейного NsXeR) в основном состоянии с разрешением 2.5 Å [3]. Подробной модели механизма обратного транспорта, настолько детальной, как для прямых помп, ещё не построено. Поэтому, исследование механизмов обратного транспорта, в том числе путём получения структур промежуточных состояний, – важнейшая

фундаментальная задача. Кроме того, обратные протонные помпы представляют и практический интерес: они являются альтернативой каналным родопсинам в качестве активаторов возбудимых клеток в оптогенетике [3].

В данной работе нами был исследован ксенородопсин из бактерии *Bacillus coahuilensis* (BcXeR). Было показано, что данный белок является обратной протонной помпой. При помощи время-разрешенной спектроскопии была исследована кинетика белка. Как и классический бактериородопсин, фотоцикл BcXeR содержит такие состояния, как L и депротонированное M состояние. Впервые была получена структура основного состояния бактериального ксенородопсина с разрешением 1.7 Å. Методами время-разрешенной кристаллографии и криотрэнпинга были получены структуры промежуточных (L и M) состояний, с разрешением до 1.6 Å. Проведён функциональный анализ мутантов BcXeR с целью установления пути переноса протона. На основе полученных данных предложена модель механизма транспорта протона.

Работа была поддержана Российским научным фондом (РНФ, грант №21-64-00018).

[1] V. Gordeliy *et al.*, “Microbial Rhodopsins,” in *Rhodopsin: Methods and Protocols*, V. Gordeliy, Ed., in *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer US, 2022, pp. 1–52. doi: 10.1007/978-1-0716-2329-9_1.

[2] K. Inoue *et al.*, “A natural light-driven inward proton pump,” *Nat. Commun.*, vol. 7, no. 1, p. 13415, Nov. 2016, doi: 10.1038/ncomms13415.

[3] V. Shevchenko *et al.*, “Inward H⁺ pump xenorhodopsin: Mechanism and alternative optogenetic approach,” *Sci. Adv.*, vol. 3, no. 9, p. e1603187, Sep. 2017, doi: 10.1126/sciadv.1603187.

Секция 4. ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ И ЛАЗЕРНОЙ ТЕРАПИИ

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ФОТОФИЗИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА РАДАХЛОРИН ПРИ ЕГО ДОБАВЛЕНИИ В КУЛЬТУРАЛЬНУЮ СРЕДУ DMEM

Investigation of photophysical characteristics of the photosensitizer Radachlorin dissolved in DMEM culture medium

*Андрей Белашов**, Анна Жихорева, Иоанна Горбунова, Максим Сасин,
Ирина Семенова, Олег Васютинский

Физико-технический институт имени А.Ф. Иоффе,
Санкт-Петербург, Россия

**e-mail: belashov.andrey.93@gmail.com*

На сегодняшний день существует множество работ, посвященных исследованию связывания различных флуорофоров с белками и другими макромолекулами. Прикрепление флуорофора к белкам может приводить к существенному изменению квантового выхода флуоресценции, изменению времени жизни возбужденного состояния, сдвигу спектров поглощения и люминесценции, а также изменению характеристик, связанных с диффузией и вращением таких комплексов. В рамках настоящей работы нами были использованы несколько методов флуоресцентной спектроскопии и микроскопии для исследования изменений, связанных с добавлением фотосенсибилизатора Радахлорин в культуральную среду DMEM.

Основными компонентами культуральной среды DMEM, используемой для поддержания жизнеспособности клеток *in vitro*, являются аминокислоты, витамины, глюкоза, стабилизаторы кислотности среды, а также другие белки и добавки. Нами было установлено, что при добавлении фотосенсибилизатора Радахлорин в такую среду происходит связывание молекул хлорина еб с бычьим сывороточным альбумином (BSA), в связи с чем происходит изменение его фотофизических характеристик. Анализ времени затухания флуоресценции фотосенсибилизатора в растворах продемонстрировал увеличение этого параметра при наличии в растворе бычьего сывороточного альбумина, содержащегося в DMEM. При образовании комплексов хлорина еб с BSA изменяется и зависимость времени затухания флуоресценции от pH

окружающей среды. Анализ время-разрешенных сигналов флуоресценции фотосенсибилизатора в клетках показал, что вероятно подавляющее количество молекул хлорина еб в клетках находится там в связанном состоянии.

Соединение хлорина еб с бычьим сывороточным альбумином влияет и на подвижность молекул фотосенсибилизатора. Значительное (в 100 раз) увеличение массы комплекса хлорина еб и BSA приводит к уменьшению подвижности молекул, что было установлено при наблюдении скорости восстановления флуоресценции при локализованном фотообесцвечивании в растворах (FRAP). В случае диффузии Радахлорина связанного с BSA, время полувосстановления интенсивности флуоресценции оказалось в 4.5-5 раз больше, чем в случае анализа водных растворов фотосенсибилизатора. В других растворах фотосенсибилизатора не содержащих BSA подобного существенного увеличения времени восстановления флуоресценции за счет диффузии фотосенсибилизатора не наблюдалось.

Также был проведен анализ времени вращательной диффузии фотосенсибилизатора Радахлорина при использовании разных растворов. Анализ двух время-разрешенных сигналов флуоресценции ортогональных поляризаций с помощью глобального фитинга позволил установить, что время вращательной диффузии Радахлорина в воде составляет 0.3 нс, в то время как в растворах BSA это время превышает 60 нс. Также нами было установлено, что при образовании комплексов молекул хлорина еб и BSA уменьшается квантовый выход синглетного кислорода.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 21-72-10044.

**ПЕРВИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ФОТОФИЗИКЕ И ФОТОХИМИИ КОМПЛЕКСОВ
ПЛАТИНОВЫХ МЕТАЛЛОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В
ФОТОХИМИОТЕРАПИИ**

**Primary processes in photophysics and photochemistry of platinum metals
prospective in photochemotherapy**

Евгений Глебов^{1,2}, Вячеслав Гривин¹, Иван Поздняков^{1,2},
Григорий Жданкин^{2,1}, Андрей Кокоренко^{2,1},
Алексей Мельников³, Данила Васильченко⁴*

¹Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского
СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³Институт спектроскопии РАН, Троицк, Москва, Россия

⁴Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН,
Новосибирск, Россия

**e-mail: glebov@kinetics.nsc.ru, тел. +7 383 3332385*

Фотохимиотерапия (ФХТ; английский термин РАСТ – Photo-Activated Chemotherapy) является перспективной технологией лечения злокачественных опухолей, объединяющей преимущества химиотерапии с использованием комплексов платиновых металлов (высокая цитотоксичность) и фотодинамической терапии (ФДТ) – селективность. Основной механизм действия ФХТ заключается в создании под действием света цитотоксичных форм комплексов платиновых металлов, которые связываются с ДНК по типу цисплатина, ингибируя транскрипцию и репликацию. ФХТ, в отличие от традиционной ФДТ, не требует наличия в тканях растворенного кислорода, что существенно, поскольку многие опухоли являются гипоксичными.

Несмотря на востребованность ФХТ, фотохимия перспективных разнолигандных комплексов платиновых металлов исследована слабо. В настоящей работе мы представляем результаты исследования фотофизики и фотохимии нескольких комплексов платины и рутения с помощью комбинации стационарных и времязрешенных (наносекундный лазерный импульсный фотолиз и фемтосекундная сверхбыстрая кинетическая спектроскопия) методов. Исследованы следующие системы:

(1) Смешаннолигандные диазидные комплексы Pt(IV): *цис, транс, цис*-[Pt(N₃)₂(OH)₂(NH₃)₂], *транс, транс, транс* - [Pt(N₃)₂(OH)₂(NH₃)₂] [1] и *транс, транс, транс* -[Pt^{IV}(N₃)₂(py)₂(OH)₂] [2]. Особенностью их фотохимии является цепной характер первой стадии

фотолиза (фотоаквации). Терапевтическое действие основано на комбинации связывания фотопродуктов с ДНК по типу цисплатина и реакций радикала N_3^\bullet .

(2) Простые комплексы Ru(II) состава *транс*-[RuCl₂(DMSO)₄] и *цис*-[RuCl₂(DMSO)₄]. Их светоиндуцированная цитотоксичная (по типу цисплатина) форма возникает в результате сверхбыстрой (короче 20 пс) реакции фотоаквации / фотоперегруппировки [3, 4].

(3) Бипиридилный комплекс Ru(II) состава [Ru(bpy)₂(NH₃)₂]²⁺, который фотохимически трансформируется в цитотоксичный по типу цисплатина комплекс [Ru(bpy)₂(H₂O)₂]²⁺. Фотоаквация происходит в микросекундном временном диапазоне, стартуя из нижнего (триплетного) электронно-возбужденного состояния исходного комплекса.

Работа была поддержана Российским научным фондом (грант № 23-13-00226).

1. A.A. Shushakov, I.P. Pozdnyakov, V.P. Grivin, V.F. Plyusnin, D.B. Vasilchenko, A.V. Zadesenets, A.A. Melnikov, S.V. Chekalin, E.M. Glebov. *Dalton Trans.* 46 (2017) 9440-9450.
2. G.I. Zhdankin, V.P. Grivin, V.F. Plyusnin, P.A. Tkachenko, D.B. Vasilchenko, E.M. Glebov. *Mendeleev Commun.* 33 (2023) 61-63.
3. S.G. Matveeva, A.A. Shushakov, I.P. Pozdnyakov, V.P. Grivin, V.F. Plyusnin, D.B. Vasilchenko, A.V. Zadesenets, A.A. Melnikov, S.V. Chekalin, E.M. Glebov. *Photochem. Photobiol. Sci.* 17 (2018) 1222-1228.
4. A.A. Shushakov, S.G. Matveeva, I.P. Pozdnyakov, V.P. Grivin, V.F. Plyusnin, D.B. Vasilchenko, A.A. Melnikov, S.V. Chekalin, E.M. Glebov. *Photochem. Photobiol. Sci.* 19 (2020) 1222-1229.

АНАЛИЗ УСЛОВИЙ РАЗВИТИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В КЛЕТКАХ-СВИДЕТЕЛЯХ ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Analysis of the conditions for the induction of oxidative stress in bystander cells under photodynamic treatment

*Анастасия Горохова**, Нина Пескова, Юлия Бугрова, Ирина Балалаева

Университет Лобачевского

*e-mail: gorokhova_a@unn.ru, тел. +7 987 7546311

Исследование молекулярных механизмов клеточной гибели, индуцируемой фотодинамической терапией (ФДТ), имеет большое прикладное и фундаментальное значение, поскольку позволяет преодолевать резистентность опухолевых клеток, тем самым повышая эффективность терапии. В исследованиях последний лет показано, что фотодинамическое воздействие способно индуцировать “эффект свидетеля” (ЭС) – явление, при котором идет передача сигнала от облучённых клеток к нецелевым, не подвергавшимся облучению, с индукцией некоего ответа последних. ЭС инициируется посредством межклеточной коммуникации и/или диффузии в среде низкомолекулярных растворимых агентов. Перспективным мессенджером ЭС может выступать пероксид водорода. Это связано с его участием в работе сигнальных каскадов в клетке, а также с тем, что пероксид водорода способен образовываться в ходе вторичных темновых процессов в течение длительного время после завершения облучения.

Целью данного исследования стал анализ продукции пероксида водорода при фотодинамическом воздействии на клетки эпидермодной карциномы человека *in vitro* и оценка его потенциальной роли при инициации эффекта свидетеля. Исследования проводили на стабильно трансфицированной клеточной линии эпидермоидной карциномы человека A431-HuPer-cyto с экспрессией чувствительного к H₂O₂ флуоресцентного сенсора HuPer. В качестве параметра, характеризующего содержание пероксида водорода и, следовательно, развитие окислительного стресса, определяли отношение регистрируемого сигнала флуоресценции HuPer при разных длинах волн возбуждения (I₄₈₈/I₄₀₅). В качестве фотосенсибилизатора использовали Фотосенс® (НИОПИК, Россия), который преимущественно локализуется в лизосомах и аппарате Гольджи. Облучение производили локально, на единичную клетку или участок цитоплазмы, через объектив конфокальной системы Axio Observer Z1 LSM-710 DUO NLO (Carl Zeiss, Германия) в диапазоне доз 50 –150

Дж/см². За ответ клеток считали повышение ратиометрического индекса (I_{488}/I_{405}), который анализировался у всех клеток в поле зрения кадра.

В результате проведенной работы было зарегистрировано накопление пероксида водорода в необлученных клетках – “эффекта свидетеля”, который последовательно развивался на протяжении всего времени наблюдения (около 100 минут после облучения). Была установлена прямая зависимость: чем дальше находится клетка-свидетель от облученной, тем позднее и слабее регистрируется развитие в ней окислительного стресса. Вероятность передачи сигнала от клетки-мишени к свидетелям увеличивается при наличии физического контакта клеток, что подтверждает гипотезу об участии в данном процессе межклеточных щелевых контактов. Было интересно отметить, что при повышении дозы облучения, клетка-мишень отвечала быстрее (чем выше доза, тем быстрее ответ), тогда как интервал до ответа свидетелей был относительно постоянен. Присутствие в среде каталазы не препятствовало развитию ответа облученной клетки, однако в таких условиях распространения сигнала к соседним клеткам не происходило, что согласуется с предположением о возможной роли H_2O_2 в качестве мессенджера и инициатора некоторых сигнальных каскадов при ФТД.

Работа выполнена в рамках проекта НЦМУ «Центр фотоники», при финансировании Министерством науки и высшего образования РФ (договор № 075-15-2022-293).

ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ОКРУЖЕНИЯ НА ФОТООБРАЗОВАНИЕ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА

How the molecular environment may influence on singlet oxygen photogeneration

Кирилл Ершов^{1,2}, Александра Пыряева^{1,2}, Роман Сафин^{1,2},
Галина Чичерина³, Сергей Валулин¹,
Сергей Кочубей⁴, Алексей Бакланов^{1,2}*

¹ИХКГ СО РАН, Новосибирск, 630090, Россия

²НГУ, Новосибирск, 630090, Россия

³ИСЭЖ СО РАН, Новосибирск, 630091, Россия

⁴ИФП СО РАН, Новосибирск, 630090, Россия

**e-mail: pyryaeva@kinetics.nsc.ru, тел. +7 383 3332383*

Молекулярный кислород очень слабо поглощает излучение во всем спектральном диапазоне от инфракрасной области до ультрафиолета, где все электронные переходы из основного состояния молекулы O₂ запрещены по спину и/или орбитальной симметрии. Однако при взаимодействии молекул O₂ с молекулами окружения происходит значительное усиление поглощения излучения кислородом. Такие условия реализуются в слабосвязанных комплексах X-O₂ как в газовой, так и в конденсированной фазе. Столкновительно-усиленное поглощение приводит к радикально новой фотохимии молекул O₂. В частности, становятся разрешенными процессы фотогенерации молекул синглетного кислорода O₂(¹Δ_g), играющих ключевую роль в фотопроцессах фотодинамической терапии.

Нами проведен комплекс исследований влияния молекулярного окружения на процессы фотообразования синглетного кислорода и установлены новые механизмы фотообразования синглетного кислорода. Первым отметим процесс, обнаруженный при лазерном фотовозбуждении слабосвязанных комплексов X-O₂. (X = C₅H₈) в молекулярных пучках [1] и газовой фазе [2], и происходящий с одновременным изменением спинового состояния обеих молекул в комплексе ${}^3({}^1X-{}^3O_2)+h\nu\rightarrow{}^3({}^3X-{}^1O_2)\rightarrow{}^3X+{}^1O_2$. Результаты исследований дают основания полагать, что этот процесс не является уникальным для изученных слабосвязанных комплексов и реализуется при фотовозбуждении слабосвязанных комплексов кислорода с любой молекулой-партнером X в любой среде (газе или конденсированной среде), содержащей кислород. Причем полоса

поглощения слабосвязанного комплекса может сдвигаться в видимую и красную область, в зависимости от энергии возбужденного триплетного состояния молекулы-партнера.

С другой стороны, при лазерном фотовозбуждении водных суспензий металлических серебряных наночастиц в полосе поглощения плазмонного резонанса образование молекул синглетного кислорода вероятно протекает в два этапа в результате трехфотонного поглощения возбуждающего излучения. Сначала происходит однофотонное возбуждение поверхностного плазмонного резонанса серебряной наночастицы с образованием молекулы супероксид аниона, адсорбированной на поверхности наночастицы, от которой в результате поглощения еще двух квантов того же лазерного импульса отщепляется электрон с образованием молекулы синглетного кислорода. Эффективность процесса образования активных частиц кислорода исследована *in vitro* при облучении клеточной культуры СПЭВ, выращенной в присутствии серебряных наночастиц, в полосе плазмонного резонанса импульсным лазерным излучением.

Установленные процессы и механизмы фотообразования синглетного кислорода с учетом влияния различного молекулярного окружения (молекулы и наночастицы) могут открывать новые перспективы развития фотодинамической и фототермальной терапии.

Ершов К.С., Пыряева А.П., Валиулин С.В. (ИХКГ СО РАН) благодарят Российский научный фонд за финансовую поддержку в рамках гранта РФФ 22-23-00921.

[1] Baklanov A.V. et al. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, 17, 28565-28573.

[2] Pyryaeva A.P. et al. *J. Phys. Chem. A*, 2020, 124, 41, 8469–8477.

**АДСОРБЦИЯ ОКТА-КАТИОННЫХ КОМПЛЕКСОВ ФТАЛОЦИАНИНА,
РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ИОНОМ МЕТАЛЛА В ЦЕНТРЕ МОЛЕКУЛЫ, НА
ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЕ**

**Adsorption of octa-cationic complexes of phthalocyanine, differing by the metal
ion in the center of the molecule, on the lipid membrane**

Д.Д. Зыкова^{1,2}, А.Н. Константинова², Е.К. Уродкова²,
Л.Е. Поздеева², В.С. Соколов²*

¹Московский физико-технический институт (НИУ)

²Институт физической химии и электрохимии
имени А.Н. Фрумкина РАН

**e-mail: dasha_ddz1924@mail.ru, тел. +7 977 7378894*

Метод фотодинамической терапии основан на применении фотосенсибилизаторов (ФС), которые при возбуждении генерируют синглетный кислород, убивающий раковые клетки и патогенные микроорганизмы. Важным фактором, определяющим эффективность ФС, является их способность связываться с клеточной мембраной. В работе изучали адсорбцию ФС на бислойной липидной мембране (БЛМ), моделирующей клеточную мембрану, измеряя скачок потенциала на границе мембраны с раствором. Изучались синтезированные в ИФХЭ РАН заряженные окта-катионные комплексы фталоцианина (Фц) $8bMgPc$, $8bZnPc$, $8bH_2Pc$, с ионами магния, цинка, либо без иона металла в центре макрокольца, а также $8bZnPc-5$, отличие которого от $8bZnPc$ – дополнительные метильные остатки у заряженных боковых групп. Склонность к агрегации Фц в воде оценивали по спектрам поглощения. Перенос Фц из ДМСО в воду приводит к гипсохромному сдвигу спектра и его уширению у комплексов $8bMgPc$, $8bZnPc$, $8bH_2Pc$, что говорит об их склонности к агрегации. Для комплекса $8bZnPc-5$ этого не наблюдается, значит $8bZnPc-5$ агрегатов в воде не образует. Все Фц адсорбировались на БЛМ в виде положительно заряженных мономеров. Вызванные адсорбцией Фц изменения ζ -потенциалов липосом измерялись методом динамического светорассеяния. Зависимости ζ -потенциала от логарифма концентрации Фц хорошо описывались теоретическими кривыми, построенными в предположении, что ζ -потенциал описывается теорией Гуи-Чепмена [1]. Определяемый по наклонам кривых суммарный заряд молекул на поверхности БЛМ соответствовал числу заряженных групп (8), ожидаемых из структуры Фц. Изменения разности граничных потенциалов $\Delta\phi$ при адсорбции Фц на БЛМ измерялись методом

компенсации внутримембранного поля. Для 8bMgPc, 8bZnPc и 8bH2Pc значения $\Delta\phi_b$ были близки, указывая, что природа иона металла незначительно влияет на их адсорбционные свойства. Значения $\Delta\phi_b$, и наклоны их зависимостей от концентрации Фц в растворе значительно превышали таковые для ζ -потенциалов, что объяснялось погружением заряженных групп Фц в липидный бислой. Значения $\Delta\phi_b$ для 8bZnPc-5 заметно превышали $\Delta\phi_b$ для остальных Фц. При встраивании 8bZnPc в БЛМ наблюдалось увеличение проводимости БЛМ, которая со временем спадала до первоначального значения. Максимальное значение проводимости было пропорционально квадрату концентрации Фц в растворе. Этот эффект объяснялся образованием липидных пор в БЛМ при встраивании в бислой агрегатов этого Фц, которые пропадали при их последующем распаде на мономеры. В случае 8bZnPc-5 увеличения проводимости не происходило, поскольку их молекулы встраиваются в БЛМ сразу в виде мономеров. Для остальных комплексов возникновение проводимости также не наблюдалось.

Полученные результаты говорят, что природа иона металла незначительно влияет на адсорбционные свойства исследуемых Фц, но, наряду с незаряженными боковыми группами может влиять на образование липидных пор при встраивании Фц в БЛМ.

Работа была поддержана фондом РФ (грант №19-13-00410-П).

1. Yu.A. Ermakov and V.S. Sokolov. In: *Planar Lipid Bilayers (BLMs) and their applications*, ed. by H.T. Tien and A. Ottova-Leitmannova. Elsevier, 2003, p. 109-141

**ВЛИЯНИЕ АМФИФИЛЬНЫХ ПОЛИМЕРОВ НА ФОТОГЕНЕРАЦИЮ
СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА В ПРИСУТСТВИИ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО В
МОДЕЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ И В УСЛОВИЯХ *IN VIVO***

**Effect of amphiphilic polymers on photogeneration of singlet oxygen in the
presence of methylene blue under model conditions and *in vivo***

*В.В. Кардунян**, *А.С. Курьянова*, *Н.А. Аксенова*, *А.Б. Соловьева*

Федеральный исследовательский центр химической физики
им. Н.Н. Семенова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4

**e-mail: VaLerysik@yandex.ru, тел. +7 495 9397503*

За последние десятилетия проблема резистентности бактерий к антибиотикам стала достаточно серьезной, что мотивировало исследователей к поиску и разработке альтернативных методов лечения различных инфекционных заболеваний. Одним из современных методов лечения локализованных поверхностных инфекций может быть антибактериальная фотодинамическая терапия (АФДТ). В основе метода ФДТ лежат цитотоксические свойства активных форм кислорода, прежде всего синглетного кислорода $^1\text{O}_2$, генерируемых красителями – фотосенсибилизаторами (ФС) в возбужденном состоянии. Для применения в качестве ФС при АФДТ исследуют, как правило, катионные ФС – порфирины и их аналоги – хлорины, бактериохлорины, короллы, фталоцианины, а также красители разной природы – в частности, метиленовый синий [1]. Ранее нами было показано, что некоторые амфифильные полимеры (АП) взаимодействуют в водной фазе с агрегированными ФС порфириновой и флуороновой природы, образуя слабосвязанные комплексы ФС-АП. Это приводит к увеличению фотокаталитической активности ФС в фотогенерации синглетного $^1\text{O}_2$ кислорода (в модельной реакции фотоокисления триптофана) и ускорению процесса заживления инфицированных ран (при лечении методом АФДТ) у лабораторных животных. [2].

В данной работе изучено влияние АП (плюроники F108 и F127, полиэтиленгликоля (ПЭГ) и поливинилпирролидона (ПВП)) на фотосенсибилизирующую активность МС в модельной реакции фотоокисления триптофана в воде. Показано, что в присутствии всех вышеуказанных АП наблюдается рост эффективной константы скорости фотоокисления триптофана. Выказано предположение, что наблюдаемый эффект связан с взаимодействием МС с амфифильными полимерами, приводящим к разагрегации ассоциатов красителя. Такая разагрегация

приводит к росту оптической плотности и интенсивности люминесценции МС. Показано, что АП, прежде всего ПВП, способны повышать фотокаталитическую активность МС в реакции окисления триптофана за счет образования слабосвязанных комплексов МС-АП, фиксируемых методом ¹H-ЯМР и спектральными методами (ЭСР и флуоресценция).

Применение систем МС-АП при лечении методом ФДТ модельных ран у лабораторных животных показало высокую эффективность, в частности, наблюдается снижение активности воспалительных процессов и увеличение скорости роста и созревания грануляционной ткани. Добавление плуроника F108 не оказало сильного прорегенеративного действия, хотя при облучении объем (но не зрелость) грануляционной ткани увеличивался. Добавление ПВП к МС значительно ускорило раневое заживление, особенно в группе облучения. Системы МС-АП могут быть перспективны для практического применения при лечении хронических поверхностных инфекций методом АФДТ.

Работа была поддержана фондом РФФ (грант № 23-23-00409), государственное задание ФИЦ ХФ РАН «№ 122040400099-5».

1. Lago ADN et.al. 2020 Association of photodynamic therapy and photobiomodulation for herpes simplex labialis resolution: case series Photodiagnosis Photodyn Ther 32 102070.
2. Solovieva AB et.al. 2020 Broad-spectrum antibacterial and pro-regenerative effects of photoactivated Photodithazine-Pluronic F127-Chitosan polymer system: In vivo study Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 210 111954.

**КАТИОННЫЕ КОМПЛЕКСЫ ФТАЛОЦИАНИНА НА БИСЛОЙНОЙ ЛИПИДНОЙ
МЕМБРАНЕ: ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ НА ИХ АДСОРБЦИЮ И
ФОТОДИНАМИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ**

**Cationic complexes of phthalocyanine on bilayer lipid membranes: the influence of
structure on their adsorption and photodynamic efficiency**

*А.Н. Константинова¹, Д.Д. Зыкова^{1,2}, Е.К. Уродкова¹,
П.Р. Суковатых³, В.С. Соколов¹*

¹Институт физической химии и электрохимии
им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва

²Московский физико-технический институт (МФТИ), Москва

³Российский химико-технический университет
им. Д.И. Менделеева, Москва

**e-mail: anna.n.gavrilchik@gmail.com, тел: +79167577756*

Для развития метода фотодинамической терапии (ФДТ) необходим поиск новых, более эффективных фотосенсибилизаторов (ФС). «Эффективность» ФДТ определяется их способностью специфично накапливаться в опухолевых клетках, связываясь с их мембранами, и окислять липиды и белки, входящие в их состав. Для успешного синтеза новых ФС необходимо понимать, какие их структурные элементы влияют как на связывание этих ФС с мембраной, так и на их фотодинамическую активность.

Изучены адсорбция и фотодинамическая активность двух схожих по структуре серий катионных фталоцианинов (Фц) [1]: свободные Фц, а также их комплексы с Zn(II), Mg (II), содержащие четыре или восемь катионных групп в периферийных (а-) или периферийных (b-) положениях (4aMPc, 4bMPc и 8bMPc, M=2H, Mg, Zn). Исследования проводились на бислойной липидной мембране (БЛМ), моделирующей клеточную мембрану [2] с помощью измерений межфазных скачков потенциала (граничного $\Delta\phi$ и ζ -потенциалов) при адсорбции или разрушении заряженных соединений на поверхности БЛМ, используя оригинальные методы, разработанные авторами.

Адсорбция исследуемых Фц приводила к изменению потенциалов, знак которых соответствовал адсорбции на БЛМ положительно заряженных молекул. Для всех Фц значения $\Delta\phi$ были больше, чем ζ -потенциалов, что объясняется погружением заряженных боковых групп исследуемых Фц в неполярную область мембраны. Структура иона в

центре макрокольца и положение боковых групп практически не влияли на значения измеренных потенциалов, указывая, что данные факторы не влияют на положение молекулы Фц в мембране.

Фотодинамическая активность Фц оценивалась по скорости разрушения R введенной в мембрану молекулы – мишени синглетного кислорода (МСК). Для всех соединений зависимости R от концентрации Фц были схожие: R линейно возрастала при концентрациях Фц меньших 1мкМ, после чего происходило насыщение с выходом на плато. Насыщение можно объяснить способностью молекул Фц тушить синглетный кислород на поверхности БЛМ. Значения R для Фц, имеющих различные ионы в центре макрокольца, практически не различались. Обнаружено саморазрушение адсорбированных на мембрану тетра-катионных комплексов Фц при их освещении. Несмотря на саморазрушение, с комплексами 4bMgPc наблюдались более высокие скорости разрушения МСК, чем с окта-катионными Фц.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что фотодинамическая активность ФС в значительной степени определяется их положением на мембране, которое в свою очередь сильно зависит от количества заместителей на периферии макрокольца.

Работа поддержана проектом РНФ № 19-13-00410-П.

1. Bunin DA et al. Robust route toward cationic phthalocyanines through reductive amination. 207. August (2022): 110768.
2. Sokolov VS et al. Voltage-sensitive styryl dyes as singlet oxygen targets on the surface of bilayer lipid membrane. 161 (2016): 162-69.

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО АГЕНТА
С КОМБИНИРОВАННЫМ ФОТОДИНАМИЧЕСКИМ
И ТАРГЕТНЫМ ДЕЙСТВИЕМ**

**Evaluation of the effectiveness of an antitumor agent with a combined
photodynamic and targeted action**

Л.В. Крылова*, Н.Н. Пескова, В.Ф. Отвагин, Н.С. Кузьмина,
А.В. Нючев, А.Ю. Федоров, И.В. Балалаева

Университет Лобачевского, 603950,
г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23

*e-mail: lu.krylova@mail.ru, тел. +7 908 1618027

Широкое применение фотодинамической терапии (ФДТ) в клинической практике ограничено вследствие недостаточной эффективности при лечении солидных опухолей. В связи с этим в настоящее время ведутся активные разработки мультимодальных фотосенсибилизаторов (ФС). Данный подход заключается в объединении ФС с цитотоксическими молекулами с другим механизмом действия, что позволяет повысить эффективность проводимой терапии [1].

Целью данной работы явилась оценка противоопухолевой эффективности конъюгата цинкового комплекса хлорина *еб* с мальтозой и вандетанибом (ZnChl-Vd). Хлорин (ZnChl) под действием света запускает фотодинамическую реакцию в клетке. Вандетаниб является ингибитором тирозинкиназной активности рецепторов ростовых факторов EGFR и VEGFR. Присоединение мальтозы предполагает повышение селективности накопления ФС в опухолевой ткани.

В ходе исследования показано, что ZnChl-Vd обладает интенсивным поглощением и флуоресценцией в красной области спектра. Квантовый выход синглетного кислорода составил около 20%. Конъюгат интенсивно накапливается в клетках эпидермоидной карциномы A431 с локализацией в лизосомах и аппарате Гольджи. Показан выраженный фотоиндуцируемый цитотоксический эффект ZnChl-Vd в отношении клеток со сверхэкспрессией EGFR. По результатам экспериментов *in vivo* продемонстрирована высокая селективность накопления конъюгата в опухоли, а также противоопухолевая активность за счет комбинированного фотодинамического и таргетного воздействия.

Полученные данные свидетельствуют об эффективности исследуемого соединения и позволяют рассматривать его в качестве потенциального агента с комбинированным действием для лечения онкологических заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант №21-73-10230).

1. Otvagin V.F., Kuzmina N.S., Krylova L.V., et.al. Water-Soluble Chlorin/Arylaminoquinazoline Conjugate for Photodynamic and Targeted Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, vol.62, P. 11182–11193.

ОЦЕНКА УРОВНЯ ТКАНЕВОГО КИСЛОРОДА ПО ЗАМЕДЛЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ЗОНДА

Delayed fluorescence of the probe for assessing the tissue oxygen level

Азамат Ишемгулов¹, Сергей Летуца^{1*}, Марина Сенчукова²

¹Оренбургский государственный университет

²Оренбургский государственный медицинский университет

*e-mail: snletuta@yandex.ru, тел. +7 903 3603306

Уровень кислорода в тканях является важным маркером биохимических процессов, а скорость его расхода при фотодинамической терапии напрямую влияет на результат лечения. В настоящей работе предложено оценивать уровень кислорода в тканях по замедленной флуоресценции (ЗФ) сенсibilизатора, возникающей в результате аннигиляции молекулы синглетного кислорода (1O_2) с триплет-возбуждённой (T_1) молекулой сенсibilизатора (синглет-триплетная аннигиляция (СТА)). Такой тип ЗФ назовем СТА-ЗФ. В качестве сенсibilизатора использовался эритрозин – краситель ксантенового ряда, имеющий высокий выход СТА-ЗФ, хорошо растворимый в воде, хорошо проникающий в ткани и обладающий стойкостью к фотообесцвечиванию. Экспериментально регистрировалась кинетика затухания СТА-ЗФ методом флэш-фотолиза. Источником возбуждения служил YAG-Nd-лазер (532 нм). Исследованы образцы ткани молочной железы *in vitro*, полученные хирургическим путём от пациентов ГАУЗ «Оренбургский областной клинический онкологический диспансер».

Ранее авторами был исследован механизм тушения замедленной эритрозина в тканях молочной железы лабораторных мышей *in vitro* и *in vivo* при импульсно-периодическом возбуждении [1-2]. Кинетическая кривая затухания ЗФ в тканях мышей отражает два параллельных процесса: термоактивированную замедленную флуоресценцию (ТЗФ) с характерным временем затухания порядка десятков мкс, и СТА-ЗФ с временем затухания единицы мкс. При наличии кислорода (т.е. в нормальных условиях) большая часть интегральной интенсивности ЗФ эритрозина в тканях приходится на первые 10 – 15 мкс и связана с СТА-ЗФ.

Эксперименты с тканями, полученными от пациентов, показали аналогичные результаты. При импульсно-периодическом возбуждении в некоторых тканях наблюдалось обратимое снижение (тушение)

интенсивности СТА-ЗФ, в большей степени в злокачественных тканях. Величина тушения увеличивалась с ростом частоты возбуждения. Авторы предполагают, что часть образуемого 1O_2 расходуется на окисление субстрата, поэтому количество свободного кислорода в ткани в ходе облучения снижается. Если этот процесс идёт активно и уровень кислорода не успевает восстановиться за время между двумя последовательными импульсами возбуждающего света, интенсивность и продолжительность СТА-ЗФ снижается. Если промежуток времени между импульсами возбуждения достаточен для насыщения ткани кислородом, первоначальная интенсивность и длительность СТА-ЗФ полностью восстанавливается.

Наличие либо отсутствие тушения СТА-ЗФ в исследуемых тканях при импульсно-периодическом возбуждении может служить диагностическим признаком, указывающим на наличие патологического процесса.

Настоящая работа выполнена в рамках госзадания (проект № FSGU-2023-0003).

1. Letuta S.N. et al. Delayed luminescence of erythrosine in biological tissue and photodynamic therapy dosimetry // *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. – 2016. – V. 163. – P. 231–236.
2. Летуа С.Н. и др. Непрерывный мониторинг содержания кислорода в тканях in vivo // *Биофизика*. – 2018. – № 62 (5). – С. 997-1003.

**АМФИПАТИЧЕСКИЕ ФОТОГЕНЕРАТОРЫ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА
ИНГИБИРУЮТ РЕПРОДУКЦИЮ ОБОЛОЧЕЧНЫХ ВИРУСОВ**

**Amphipathic photogenerators of singlet oxygen inhibit reproduction
of enveloped viruses**

*Ксения А. Мариевская¹, Максим С. Красильников^{1,2},
Степан П. Чумаков¹, Даниил А. Гвоздев³, Михаил Ю. Житлов^{1,2},
Игорь Э. Михновец¹, Тимофей Д. Никитин¹, Алексей А. Чистов¹,
Владимир А. Коршун^{1*}, Вера А. Алфёрова¹, Алексей В. Устинов¹*

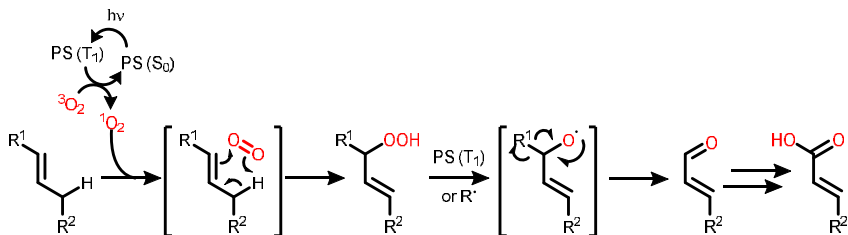
¹Институт биоорганической химии им М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова, Москва, 117997

²Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

³Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234

*e-mail: v-korshun@yandex.ru, тел. +7 499 7246715

Многие опасные вирусы (грипп, геморрагические лихорадки, гепатиты, SARS-CoV-2 и др.) являются оболочечными, т.е. вирионы поверх капсида имеют дополнительную липидную оболочку. Она происходит из клетки-хозяина и не кодируется в вирусном геноме. Повреждение липидной мембраны вириона приводит к снижению вирулентности, что можно использовать для создания противовирусных препаратов широкого спектра (активных в отношении многих вирусов), к которым вирусы не могут выработать резистентность путём мутаций. Однако, не будут ли липид-направленные препараты проявлять высокую токсичность в отношении клеток? Найти «терапевтическое окно» возможно, поскольку 1) вирионы в сотни и тысячи раз меньше хозяйских клеток; 2) клетки, в отличие от вирионов, имеют систему репарации повреждённых липидов. Одним из наиболее мощных способов повреждения липидной оболочки вирионов является действие синглетного кислорода. Окисление непредельных липидов в результате еновой реакции нарушает способность вирусной мембраны к слиянию с клеточной, что предотвращает проникновение генетического материала вируса в клетку. На рисунке ниже приведена схема фотогенерации синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$) фотосенсибилизатором (PS) и последующие процессы, приводящие к окислению ненасыщенных липидов [1].



Таким образом, амфифильные, способные встраиваться в липидную мембрану фотогенераторы синглетного кислорода, часто обладают высокой активностью в отношении оболочечных вирусов [1–5]. Мы разрабатываем противовирусные препараты на основе производных пентациклического ароматического углеводорода перилена и красителей BODIPY. Хотя такие препараты не пригодны для системного применения, потенциально возможно их использование в качестве средств профилактики заражения вирусами через респираторный тракт и для уменьшения титра вируса в крови с помощью фотоаутоотрансфузии.

Исследование поддержано Российским научным фондом (грант № 23-15-00158).

1. Alferova V.A. et al. *Annu Rep Med Chem* 2022 58 93–156 [10.1016/bs.armac.2022.08.001]
2. Mariewskaya K.A. et al. *Molecules* 2021 26 3971 [10.3390/molecules26133971]
3. Mariewskaya K.A. et al. *Int J Mol Sci* 2023 24 188 [10.3390/ijms24010188]
4. Chistov A.A. et al. *Antivir Res* 2023 209 105508 [10.1016/j.antiviral.2022.105508]
5. Strakova P. et al. *Virus Res* 2023 *submitted*

**ВТОРИЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ H_2O_2 В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПОСЛЕ
ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ С ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРАМИ
РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ**

**Secondary H_2O_2 accumulation in cancer cells induced by photodynamic treatment
with photosensitizers of different intracellular localization**

Нина Пескова, Анастасия Горохова, Наталья Шлягина,
Анна Брилкина, Ирина Балалаева*

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
Нижний Новгород, Россия

**e-mail: nin-22@yandex.ru, тел. +7 960 1808814*

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – метод диагностики и лечения злокачественных новообразований, основанный на избирательном накоплении в опухолевой ткани фотосенсибилизатора (ФС), способного при локальном воздействии света с длиной волны, соответствующей его максимуму поглощения, генерировать цитотоксические агенты, вызывающие гибель опухолевых клеток. Для повышения эффективности поражения злокачественных клеток и защиты окружающих нормальных тканей необходимо всестороннее изучение молекулярно-клеточных процессов, протекающих при ФД-воздействии. Особый интерес вызывает исследование роли H_2O_2 , как основного эффектора ФД-реакции, а также участника внутриклеточных сигнальных каскадов.

Цель данной работы – анализ динамики вторичной продукции H_2O_2 в цитоплазме и митохондриях клеток после ФД-воздействия в присутствии гидрофильного и мембранотропного ФС.

Исследования проводились на стабильно трансфицированных клеточных линиях эпидермоидной карциномы человека А431 с экспрессией генетически кодируемого сенсора Нупер в цитоплазме (А431-Нупер-cyto) и митохондриях (А431-Нупер-mito) клеток. Поскольку Нупер чувствителен к содержанию H_2O_2 и характеризуется изменением спектра возбуждения флуоресценции при окислении, в работе был использован ратиометрический метод определения концентрации H_2O_2 . Для этой цели нами определялось отношение регистрируемого сигнала флуоресценции Нупер при разных длинах волн возбуждения (I_{488}/I_{405}). В качестве ФС использовались клинически одобренный препарат Фотосенс® (ФГУП ГНЦ НИОПИК, Россия) (далее PhS) и соединение из класса цианоарилпорфиразинов – тетраакис(бензилоксифенил)тетрацианопорфиразин (далее Pz),

синтезированное в Институте металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН. Для PhS характерна локализация в лизосомах, тогда как Pz преимущественно накапливается в ЭПР и аппарате Гольджи. С целью ФД-воздействия клетки кратковременно (секунды) облучались в дозах 15, 25 и 50 Дж/см². ФД-воздействие приводило к монотонному увеличению содержания H₂O₂ в цитоплазме и митохондриях клеток в течение длительного времени после окончания облучения (более часа), а наличие дозозависимого латентного периода между воздействием и ответом может свидетельствовать о том, что накопление H₂O₂ обусловлено вторичными биохимическими процессами. Необходимо отметить, что в зависимости от физико-химических свойств ФС, митохондриальная продукция H₂O₂ может как опережать его накопление в цитоплазме, так и отставать по времени. Показано, что изменение I₄₈₈/I₄₀₅ не связано с возможным изменением pH в клетках. Присутствие в среде синтетического антиоксиданта N-ацетил-L-цистеина ингибирует накопление H₂O₂ и приводит к повышению жизнеспособности облученных клеток.

Таким образом, ФД-воздействие сопровождается вторичной продукцией H₂O₂, а его источники в клетках могут отличаться в зависимости от физико-химических свойств ФС.

Работа выполнена в рамках проекта НЦМУ «Центр фотоники», при финансировании Министерством науки и высшего образования РФ (договор № 075-15-2022-293). Н.Н. Пескова благодарит за персональную поддержку в форме стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам (СП-2067.2021.4).

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СТРУКТУРЫ ТЕРАНОСТИКА НА
ФЛЮОРЕСЦЕНЦИЮ И ФОТОДИНАМИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ**

**Study of the influence of theranostic structure on fluorescence
and photodynamic activity**

Д.А. Притъмов^{1}, М.А. Грин¹, М.А. Павлова², П.А. Панченко²,
О.А. Фёдорова², Н.Б. Морозова³,
А.Д. Плутинская³, А.А. Панкратов³*

¹РТУ-МИРЭА, 119454, Россия, Москва, пр. Вернадского, 86

²ИНЭОС РАН, 119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, 28

³МНИОИ им. П. А. Герцена, 125284, Россия,
Москва, 2-й Боткинский пр., 3

**e-mail: dimanick96@mail.ru, тел. +7 925 8229865*

Фотодинамическая терапия рака (ФДТ) – перспективный низкоинвазивный метод лечения онкологии, обладающий рядом преимуществ. Однако, существует потребность в разработке новых терапевтических агентов с улучшенными свойствами, такими как увеличение длины волны абсорбции света, что обеспечивает доступность к лечению глубоко залегающих опухолей, повышение генерации синглетного кислорода, а также комбинировании ФДТ с другими видами лечения или диагностики.

Целью нашего исследования была разработка тераностиков, совмещающих флюоресцентную диагностику за счёт нафталимидного фрагмента с последующей терапией злокачественных тканей лазером с переключаемой длиной волны посредством активации фрагмента на основе производного порфирина.

В ходе данной работы была получена серия конъюгатов на основе природных хлорина и бактериохлорина, ковалентно связанных с нафталимидами, отличающимися заместителями в положении 4, посредством спейсеров разной длины и природы, а также с изменением положения в порфириновом макроцикле. Спектральный анализ показал, что при фотовозбуждении соединений при длине волны поглощения нафталимида, происходит внутримолекулярный перенос энергии на порфириновый фрагмент, причём в хлориновых конъюгатах, на примере соединений с 4-(3,4-диметоксистирил)-1,8-нафталимидом и 4-(4-N,N-диметилстирил)-1,8-нафталимидом, связанными с порфирином коротким -C₂H₄- спейсером, этот перенос был ниже на 2% и 7% соответственно, а изменение положения конъюгации с 13¹- на 15²- в макроцикле хлорина

дополнительно уменьшило перенос на 1%. Однако, наибольшего эффекта в снижении переноса энергии удалось достичь за счёт введения дисульфидного спейсера – испытания *in vitro* показали, что под действием глутатиона в клетках опухоли конъюгат разделяется и компоненты могут действовать независимо.

Таким образом наряду с модификациями каждого хромофора в тераностиках такого вида может производиться как введение более сложных спейсеров, так и использование расщепляемых «unclick»-спейсеров.

1. Pavlova M.A.; Panchenko P.A.; Alekhina E.A.; Ignatova A.A.; Plyutinskaya A.D.; Pankratov A.A.; Pritmov D.A.; Grin M.A.; Feofanov A.V.; Fedorova O.A. A New Glutathione-Cleavable Theranostic for Photodynamic Therapy Based on Bacteriochlorin e and Styrylnaphthalimide Derivatives. *Biosensors* 2022, 12, 1149. <https://doi.org/10.3390/bios121211492>.

СЕЗОННЫЙ И 11-ЛЕТНИЙ ЦИКЛИЧЕСКИЙ ХАРАКТЕР ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В.Е. Прокопьев

Томский государственный университет 634050, Российская Федерация,
 Томск, ул. Ленина, д. 36

e-mail: prokop@ogl.hcei.tsc.ru

Полный жизненный цикл существования вирусных образований можно разделить на две части: первая включает в себя жизненный цикл вируса в клетке, вторая – распространение и выживание вируса во внешней среде. В данной работе изучаются вторая часть жизненного цикла вирусных частиц.

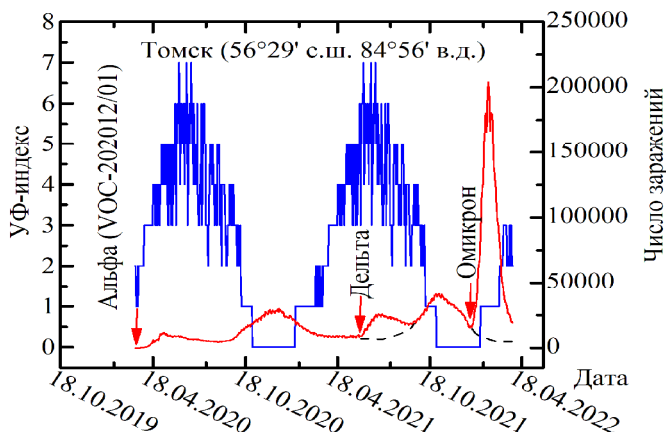


Рис. 1. Сезонный характер поведения заболеваемости COVID-19 в РФ (Россия).
 1 - значение УФИ (UVI) для Томска и 2-число ежедневных новых заболеваний для
 России (данные ресурсного центра института Джонса Хопкинса).

В работе на основе ежедневных двухлетних наземных измерений спектра солнечного излучения в УФБ диапазоне 280 – 320 нм и ультрафиолетового индекса в г. Томске ((N) 56°29', (E) 84°57') с 26.03.2020 по 26.03.2022 г.г. и их сравнения с числом ежедневных подтвержденных новых случаев COVID-19 для России (40° – 60° с.ш.) полученных из банка данных ресурсного центра по коронавирусу (КВ) университета Джонса

Хопкинса (CRC-ЖНУ) показано, что заболеваемость этой болезнью для средних широт (с.ш.) Земли имеет сезонный характер и определяется спектром фотобиологической инактивации генома и активного центра S-белка (рис. 1). Кроме того, УФИ индекс зависит не только от сезона, но и активности Солнца (рис. 2).

Как видно из (рис. 1) максимальные значения заболеваемости совпадают с минимальными значениями УФ-индекса $\leq 4 - 5$. Исключения могут составлять только моменты возникновения новых мутаций КВ (дельта), омикрон и т.д.

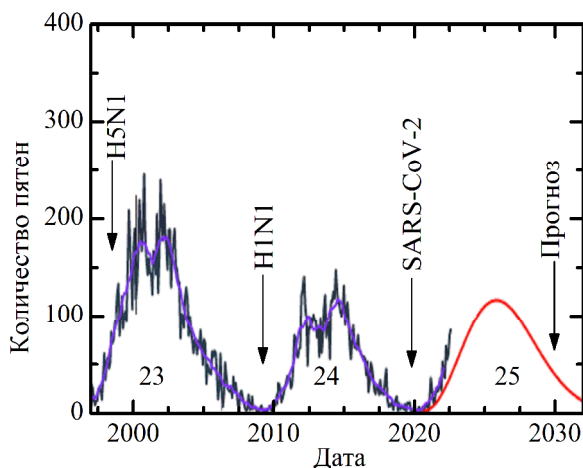


Рис. 2. Циклы солнечной активности и возникновение эпидемий.

На (рис. 2) стрелками показаны моменты возникновения новых заболеваний, совпадающие с минимумами солнечной активности, что согласуется с гипотезой, высказанной А.Л. Чижевским.

Выводы.

I. Сезонный характер распространения вирусных заболеваний определяются ультрафиолетовой погодой. При $УФИ \geq 4$ скорость выживания вирусов в окружающей среде низка (≈ 0)

II. 11-летний цикл эпидемий (пандемий) определяется 11-летними циклами солнечной активности и повышенной интенсивностью СИ в области спектра УФВ (280 – 320 нм) в это время.

III. Следующий пик заболеваемости КВ должен наблюдаться в декабре 2030 г.

АКТИВИРУЕМЫЙ ИЗЛУЧЕНИЕМ БЛИЖНЕГО ИНФРАКРАСНОГО ДИАПАЗОНА ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОР ДЛЯ АНТИМИКРОБНОЙ ФОТОТЕРАПИИ

М.П. Самцов^{1}, А.П. Луговский¹, Н.В. Белько¹, Д.С. Тарасов¹,
Е.С. Воронай¹, Н.В. Козобкова², А.П. Савицкий², М.О. Шлеева²*

¹Научно-исследовательское учреждение «Институт прикладных физических проблем имени А.Н. Севченко» Белорусского государственного университета, Минск, 220045, Беларусь

²Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, 119071, Россия

**e-mail: samtsov@mail.ru, тел. +375 29 7052145*

Целью данной работы являлось разработка метода фотодинамической инактивации *Mycobacterium smegmatis* – близкого генетического родственника возбудителя туберкулеза фотосенсибилизаторами (ФС) на основе трикарбоцианиновых красителей. В качестве ФС – трикарбоцианиновый краситель **1**, содержащий две карбоксильные группы при концевых гетероостатках, а также красители **2** и **3**, обе карбоксильные группы которых этерифицированы низкомолекулярным полиэтиленгликолем или трегалозой соответственно. Суточную культуру клеток *M. smegmatis*, для которой оптическая плотность составляла $OD_{590} > 1$, разбавляли средой NB до оптической плотности $OD_{590} = 0,2$ и инкубировали с красителями в течение 2 ч при температуре 37°C в темноте при постоянном перемешивании. Облучение производилось излучением светодиода 740 нм (THORLABS, США) при плотности мощности 260 мВт/см². Экспозиционная доза для образцов составляла 78, 234, 468 Дж/см², что соответствовало времени облучения 5, 15 и 30 минут. Оценка жизнеспособности бактерий проводили путем высева на агаризованную среду NB методом разведений.

В результате выявлено, что при концентрации 40 мкМ красителя **2** и световой дозе 468 Дж/см² наблюдается значительная гибель клеток *M. smegmatis* (89%). При световой дозе 78 Дж/см² погибает 50 % бактериальных клеток. Использование гидрофобной формы ФС (красителя **1**) демонстрировало более выраженный фотодинамический эффект. При концентрации 40 мкМ красителя **3** и световой дозе 468 Дж/см² количество погибших клеток *M. smegmatis* составило 100 %.

В результате исследования фотофизических свойств красителей в суспензиях *M. smegmatis* после инкубации выявлено комплексообразование молекул красителей с компонентами клеточной стенки микобактерий. На это указывает увеличение от 0,4 нс до 0,8 – 1,0 нс времени затухания флуоресценции красителей в суспензии с *M. smegmatis* по сравнению с раствором в фосфатно-солевом буфере. А также наблюдаемое bathochromное смещение спектров поглощения, флуоресценции и возбуждения флуоресценции красителей в *M. smegmatis* свидетельствует о низкой полярности микроокружения молекул красителей. Путем регистрации спектров поглощения в суспензии клеток *M. smegmatis* после инкубации с красителями и отмытки проведено исследование их накопления в бактериях *M. smegmatis*. Установлено, что концентрация красителя **3**, функционализированного трегалозой, в 3 – 4 раза выше по сравнению с незамещенным соединением **1**, т.е. лучше накапливается в микобактериях. Такое соотношение концентраций красителей в микобактериях согласуется с данными по фотоинаktivации *M. smegmatis* при воздействии излучением светодиода с длиной волны 740 нм.

Результаты исследований впервые демонстрируют возможность фотоинаktivации микобактерий *in vitro* быстрорастущего родственника возбудителя туберкулеза – *Mycobacterium smegmatis* фотосенсибилизатором активируемым излучением в ближнем инфракрасном диапазоне. Показано, что концентрация функционализированного трегалозой красителя в 3 – 4 раза выше в микобактериях по сравнению с незамещенным соединением, что обеспечивает существенное повышение эффективности фотоинаktivации *M. smegmatis*.

ШТАММОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ УСТОЙЧИВОСТИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* К ФОТОДИНАМИЧЕСКОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ

Strain differences in resistance of *Staphylococcus aureus* to photodynamic exposure

*Елена Тучина**, *Мария Корченова*,
Татьяна Шарбарина, *Екатерина Ефимова*

Саратовский национальный исследовательский государственный
университет им. Н.Г. Чернышевского

*e-mail: tuchinaes@gmail.com, тел. +7 917 2015938

В настоящее время инфекции, ассоциированные с антибиотико-резистентными штаммами микроорганизмов, в том числе *Staphylococcus aureus*, представляют наибольшую опасность при инфекционных заболеваниях ЛОР-органов и при постхирургических осложнениях [1]. Представляет интерес изучение различий в реакциях разных штаммов *S. aureus* к ФДТ с использованием различных типов оптического излучения и фотосенсибилизаторов.

Объектами исследования служили метициллин-чувствительный музейный штамм *S. aureus* 209 P (ГИСК им. Л.А. Трасевича, г. Москва), метициллин-чувствительный клинический штамм *S. aureus* 5, метициллин-устойчивый клинический штамм *S. aureus* 11. Микроорганизмы выращивали при температуре 37 °С на ГРМ-агаре (Россия, г. Оболенск). Эксперимент проводили по методике, описанной ранее [2].

В качестве источников излучения использовали: 1) светодиод с максимумом спектра испускания $\lambda=405$ нм и плотностью мощности 70 мВт/см² (СИ); 2) светодиод с максимумом спектра испускания $\lambda=660$ нм и плотностью мощности 40 мВт/см² (КИ); 3) лазер с максимумом спектра испускания $\lambda=808$ нм и плотностью мощности 50 мВт/см² (ЛИ). Во всех экспериментах режим излучения был непрерывный. Время облучения варьировали от 5 до 30 мин. Фотосенсибилизаторами выступали следующие вещества: 1) водорастворимый мезозамещенный катионный пиридилпорфирин H₂ТОЕ4РyР (ПФ) в концентрации 0,01 мг/мл; 2) метиленовый синий в концентрации 0,0001 мг/мл (МС); 3) индоцианиновый зеленый в концентрации 0,1 мг/мл (ИЗ).

Данные об изменении численности исследуемых микроорганизмов выражены в lgКОЕ/мл и представлены в таблице 1

Таблица 1. Чувствительность бактерий *S. aureus* к 30-ти минутному фотодинамическому воздействию различных комбинаций «излучение-фотосенсибилизатор», lgКОЕ/мл ($p \leq 0,05$)

Штамм	405 нм			660 нм			808 нм		
	Контроль	СИ	СИ+ПФ	Контроль	КИ	КИ+МС	Контроль	ЛИ	ЛИ+ИЗ
<i>S. aureus</i> 209P	7±0,4	6±0,3	4±0,2	7±0,3	6±0,3	3±0,2	7±0,3	6±0,3	4±0,2
<i>S. aureus</i> 5	7±0,3	6±0,2	5±0,2	7±0,3	6±0,2	2±0,1	7±0,2	6±0,2	4±0,3
<i>S. aureus</i> 11	7±0,2	5±0,3	2±0,1	7±0,4	6±0,2	3±0,2	7±0,3	5±0,2	3±0,1

Показано, что имеются внутривидовые различия в реакции клеток трех штаммов золотистого стафилококка к использованным типам излучения. Наиболее подвержен синему (405 нм) светодиодному излучению в сочетании с порфирином клинический метициллин-резистентный штамм *S. aureus* 11, который был также сильнее остальных подвержен действию лазерного (808 нм) излучения и индоцианина зеленого. Клинический метициллин-чувствительный штамм *S. aureus* 5 демонстрировал выраженную устойчивость к синему излучению и был крайне восприимчив к комбинации красного излучения и метиленового синего.

1. Hoenes K., Bauer R., Meurle T., Spellerberg B., Hessling M. Inactivation Effect of Violet and Blue Light on ESKAPE Pathogens and Closely Related Non-pathogenic Bacterial Species – A Promising Tool Against Antibiotic-Sensitive and Antibiotic-Resistant Microorganisms // Front. Microbiol. 2021. Vol. 11. P. 612367. doi: 10.3389/fmicb.2020.612367

2. Gyulkhandanyan A. G., Paronyan M. H., Gyulkhandanyan A. G., Ghazaryan K. R., Parkhats M. V., Dzhagarov B. M., Korchenova M. V., Lazareva E. N., Tuchina E. S., Gyulkhandanyan G. V., Tuchin V. V. Meso-substituted cationic 3- and 4-N-Pyridylporphyrins and their Zn(II) derivatives for antibacterial photodynamic therapy // Journal of Innovative Optical Health Sciences. 2022. V. 15, N. 01. P. 2142007. <https://doi.org/10.1142/S1793545821420074>

**МОЛЕКУЛЯРНЫЙ НАНОМОТОР ЯВЛЯЕТСЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОМ,
СПОСОБНЫМ ВЫЗЫВАТЬ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ
ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН**

**Molecular nanomotor is a photosensitizer capable of inducing photodynamic
damage to lipid membranes**

Александр М. Фирсов^{1}, Татьяна И. Рокицкая¹, Антон С. Бендикис²,
Антон С. Козлов², Елена А. Котова¹,
Александр А. Красновский², Юрий Н. Антоненко¹*

¹НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского
МГУ имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Россия

²Институт биохимии имени А.Н. Баха, Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071,
Москва, Россия

**e-mail: firsov@belozersky.msu.ru.*

В настоящее время общепринятой является жидкостно-мозаичная модель биологических мембран, предполагающая, что липидный бислой ведет себя подобно жидкости. В недавних работах двух лабораторий [1,2] были опубликованы данные о том, что так называемые «молекулярные моторы» — молекулы, одна часть которых вращается относительно другой — способны увеличивать проницаемость искусственных и клеточных мембран. Авторы утверждали, что такие «наномашинны» действуют по принципу сверла, продельвая отверстия в мембране под действием света. На основании ранее полученных данных [3] мы предположили, что нарушение целостности мембран вызвано не сверлением, маловероятным для жидкостей, а фотодинамическим повреждением липидов.

С помощью измерения вытекания карбоксифлуоресцеина из липосом мы показали, что повреждение мембран при возбуждении светом в полосу поглощения молекулярного мотора МЗ происходит вследствие фотоиндуцированного перекисного окисления липидов (ПОЛ). Во всех экспериментах пермеабилзация наблюдалась лишь при наличии ненасыщенных липидов в мембране липосом, тогда как везикулы, сформированные из полностью насыщенных липидов, были устойчивы к воздействию света в присутствии МЗ, что характерно для фотодинамической индукции ПОЛ.

С помощью прямого метода измерения флуоресценции при 1270 нм в лаборатории А.А. Красновского удалось зарегистрировать

образование синглетного кислорода с квантовым выходом порядка 2% при возбуждении молекулярного мотора МЗ, растворенного в гексафторбензоле или четыреххлористом углероде.

Способность МЗ к фотосенсибилизации была подтверждена нами в опытах по фотоинаktivации ионных каналов, образованных грамицидином А в плоских бислойных липидных мембранах (БЛМ). Благодаря наличию четырех остатков триптофана, расположенных в области мембраны, близкой к границе раздела мембрана-вода, грамицидин А чувствителен к фотодинамическому воздействию [4]. Освещение БЛМ в присутствии МЗ приводило к снижению индуцированного грамицидином А электрического тока, подобно тому, как это наблюдалось ранее с применением классических фотосенсибилизаторов.

Таким образом, мы показали, что используемое в качестве наномашин соединения МЗ представляет собой фотосенсибилизатор, способный индуцировать фотодинамическую пермеабиллизацию липидных мембран.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 21-14-00062).

1. Garcia-Lopez et al. Molecular machines open cell membranes, *Nature* 548 (2017) 567-572.
2. Ribovski et al. Light-induced molecular rotation triggers on-demand release from liposomes, *Chem. Commun.* 56 (2020) 8774-8777.
3. Pashkovskaya et al. Light-triggered liposomal release: membrane permeabilization by photodynamic action. *Langmuir* 26 (2010) 5726–5733.
4. Rokitskaya et al. Photodynamic inactivation of gramicidin channels: a flash-photolysis study. *BBA-Bioenergetics* 1275 (1996) 221–226.

**РАЗРАБОТКА ТАРГЕТНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ
ПРИРОДНЫХ ХЛОРИНОВ ДЛЯ ТЕРАПИИ И ДИАГНОСТИКИ В ОНКОЛОГИИ**

**Development of targeted drugs based on natural chlorins for therapy and
diagnostics in oncology**

Михаил Грин

МИРЭА – Российский технологический университет, Институт тонких
химических технологий им. М. В. Ломоносова, 119571, Россия, Москва,
пр-кт Вернадского, 86

e-mail: michael_grin@mail.ru, тел. 8 916 3047105

В последние годы для повышения результативности противоопухолевой терапии разрабатываются полифункциональные препараты, обеспечивающие селективную доставку активной фармацевтической субстанции (АФС) в опухоль. Биологически активные молекулы различной природы, включая аминокислоты, пептиды, белки, биогенные амины реализуют взаимодействие фотосенсибилизаторов с внутриклеточными мишенями, либо рецепторами опухолевых клеток, что позволяет существенно увеличить эффективность воздействия на опухоль.

В настоящей работе реализована оптимизация структуры высокоэффективного ИК-фотосенсибилизатора на основе *O*-пропиллоксим-*N*-пропоксикарбиопурпуринимида путем введения на периферию макроцикла метиловых эфиров *L*-лизина, *L*-аргинина, 3-го домена альфа-фетопротейна, гистамина и гистидина, а также комплексов золота (I) и олова (IV) для мишень-ориентированной внутриклеточной доставки пигментов [1]. Кроме этого, разработан прототип радиотрейсера на основе ингибитора ПСМА и ^{99m}Tc для диагностики/терапии рака предстательной железы для доклинических исследований.

Все предложенные таргетные препараты бактериохлоринового ряда проявили фотоиндуцированную противоопухолевую активность, которая превысила цитотоксичность бактериохлоринов без введенных векторных молекул. Сравнительное изучение темновой и фотоиндуцированной цитотоксичности конъюгатов и их металлокомплексов позволило оценить вклад малых молекул и металлов в общую цитотоксичность.

Оптимизация структуры бактериохлоринов позволяет повысить интернализацию их в опухолевые клетки, а увеличение цитотоксичности



может быть объяснено участием присоединенных молекул в биохимических процессах опухолевых клеток.

Работа была поддержана Программой стратегического академического лидерства РТУ МИРЭА «Приоритет-2030» (проект «Радиофармпрепараты 2023»).

I. S.Tikhonov, P. Ostroverkhov., N. Suvorov, A. Mironov, Y. Efimova, A. Plutinskaya, A. Pankratov, A. Ignatova, A. Feofanov, E. Diachkova, Y. Vasil'ev, M. Grin.
International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(24), 13563.

**ВЛИЯНИЕ ШИРОКОПОЛОСНОГО КРАСНОГО СВЕТА НА ПРЕДИКТОРЫ
ВОСПАЛЕНИЯ У ЖИВОТНЫХ С МОДЕЛЬЮ МИОФАСЦИАЛЬНЫХ
ТРИГГЕРНЫХ ТОЧЕК**

**Effect of Broadband Red Light on Inflammation Predictors in Animals with a
Myofascial Trigger Point Model**

*Н.А. Щелчкова^{1,2}, Т.И. Васягина¹, Р.Д. Лапшин¹,
И.И. Белоусова¹, А.П. Баврина^{1*}*

¹Приволжский исследовательский медицинский университет
Министерства здравоохранения Российской Федерации

²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
Нижний Новгород

**e-mail: bavrina_a@pimunn.net, тел. +7 904 0401694*

Распространенность миофасциального болевого синдрома (МБС) среди населения достигает 85% в следствие сочетания гиподинамии и статической нагрузки офисных профессий свидетельствует о актуальности проблемы для научных исследований. Основу клинических симптомов МБС связывают с формированием миофасциальных триггерных точек (МТТ). Формирование гипоперфузии и энергетического дефицита в зоне МТТ, в результате сдавления сосудов мышц, нарушает сократимость мышечного волокна и приводит к запуску воспалительных реакций. Фотобиостимуляция поврежденной ткани широкополосным красным светом (ШКС) приводит к запуску внутриклеточных процессов, активирующих регенерацию и снимающих системную воспалительную нагрузку.

Цель исследования: изучить влияние широкополосного красного света на содержание интерлейкина-8 (ИЛ-8), фактора некроза опухоли-альфа Tumor necrosis factor (TNF- α), диеновых конъюгатов (ДК) в сыворотке крови крыс с моделью миофасциальных триггерных точек.

Материалы и методы. Объектом исследования явились самцы половозрелых крыс линии Wistar, n=24. Животные были разделены на 3 группы: интактная группа (n=8), с моделью МБС (n=16), часть которых подвергалась фотобиостимуляции (n=8). Моделирование МБС у крыс согласно методу Huang et al, 2013 [1] приводило к формированию мышечных уплотнений – МТТ. Фотобиомодуляцию проводили ежедневно в течение четырех дней с помощью аппарата Спектр ЛЦ-02 (Россия). Время сеанса облучения составляло 3 мин. Характеристики излучения: длина волны 650 \pm 30 нм; диаметр светового пятна 0,002 м²; интенсивность

излучения в зоне засветки 50 мВт/см²; с непрерывным режимом работы светодиодов; плотность потока энергии (доза облучения) 6 Дж/см². Забор крови осуществляли в утренние часы, сыворотку получали методом центрифугирования. До проведения анализа биоматериал хранился при –70°С. Достоверность различий между группами определялось методом Манна-Уитни.

Моделирование МБС приводило к значимому росту содержания TNF-α в крови экспериментальных животных относительно уровня интактных животных (4,20 ± 0,27 пмоль/мл и 2,90 ± 0,08 пмоль/мл, соответственно). Курсовое применение ШКС на фоне МБС достоверно снижало уровень TNF-α до уровня интактной группы (3,30 ± 0,13 пмоль/мл).

Концентрация ИЛ-8 в крови крыс после МБС достоверно не изменялась по сравнению с интактными показателями. Курсовое облучение животных с МБС вызывало уменьшению данного показателя на 28%.

Изучение первичных продуктов перекисного окисления выявило достоверный рост ДК в крови после МБС относительно интактных показателей (106,71 ± 6,25 нмоль/мл и 77,55 ± 2,30 нмоль/мл, соответственно). Применение ШКС после МБС вызывало падение концентрации ДК в крови животных до уровня интактных значений (83,25 ± 6,10 нмоль/мл).

Таким образом, активация фотофизических и фотохимических процессов в поврежденной ткани после многократного локального облучения ШКС, приводит к нормализации концентрации предикторов воспаления после моделирования МБС.

Работа выполнена в рамках Государственного задания 121030100281-9 в ЕГИСУ НИОКТР

1. Huang Q.M., Ye G., Zhao Z.Y., Lv J.J., Tang L. Myoelectrical activity and muscle morphology in a rat model of myofascial trigger points induced by blunt trauma to the vastus medialis // *Acupunct Med*, 2013, Mar; 31(1), p.65-73; doi: 10.1136/acupmed-2012-010129.

Секция 5. БИОФОТОНИКА МОЛЕКУЛ, НАНОЧАСТИЦ, КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

СУБМИКРОННЫЕ ЧАСТИЦЫ ОКСИДОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ, ОБЛАДАЮЩИЕ ФОТОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ, И ИХ АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА

Submicron particles of heavy metal oxides with photocatalytic activity and its antimicrobial properties

Надежда Аникина, Андрей Шишкин, Ольга Смирнова, Василий Смирнов,
Андрей Корягин, Евгений Сулейманов*

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского

**e-mail: biodeg@mail.ru, тел. +7 951 9171015*

Оксиды тяжелых металлов, обладающие фотокаталитической активностью, находят широкое применение в качестве антимикробных препаратов в медицине, ветеринарии и биотехнологии. Это связано с их фотокаталитической активностью, в результате чего образуются активные формы кислорода (АФК), способные ингибировать жизнедеятельность микроорганизмов. В настоящее время большой интерес представляют оксиды тяжелых металлов, проявляющие активность в видимом свете. В этом плане в НИИХ ННГУ были синтезированы сложные оксиды тяжелых металлов CsTeMoO₆ и RbTe_{1.5}W_{0.5}O₆. Ранее при помощи спектроскопии диффузного отражения было показано, что соединение CsTeMoO₆ имеет достаточно широкую запрещенную зону ~ 3.1 эВ, которая соответствует УФ диапазону. Однако совмещение результатов спектроскопии отражения и пропускания позволило сделать вывод о наличии у соединения внутри зоны двух примесно-дефектных уровней с энергиями 2 и 2.6 эВ. Соединение RbTe_{1.5}W_{0.5}O₆ имеет линии поглощения при ~2.51 эВ. При поглощении фотонов с энергией от ~2 эВ оба сложных оксида способны к образованию электронно-дырочных пар, которые приводят к реакциям окисления органических веществ. Окисление органических соединений может происходить как напрямую через взаимодействие с образованными электронами и дырками, так и с помощью формирующихся гидроксильных и супероксидных радикалов. Кроме того, возможны вторичные реакции между радикалами с образованием перекиси водорода, которая также выступает сильным окислительным агентом. Сравнивая антимикробную активность сложных оксидов CsTeMoO₆ и RbTe_{1.5}W_{0.5}O₆ в

условиях воздействия одного и того же источника света (мощность 50 Вт; поверхностная плотность потока составляла 524 Вт/м^2) и в одинаковой концентрации (2 мг/мл) можно отметить следующее: сложный оксид рубидия оказывал намного более сильное ингибирующее действие на бактерии *E. coli* и *Staph. aureus*, а также на вегетативный мицелий гриба *P. chrysogenum* по сравнению с оксидом цезия как в условиях темноты, так и света, несмотря на схожее электронное строение и близкий размер частиц. Это может быть связано с разной реакционной способностью электронно-дырочных пар и с разной эффективностью протекания реакций их генерации. На основе полученных результатов, возможно избирательно регулировать активность данных соединений по отношению к определенным группами и видам микроорганизмов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (базовая часть Госзадания, проект FSWR-2020-0053) с использованием оборудования ЦКП «Новые материалы и ресурсосберегающие технологии» (ННГУ им. Н.И. Лобачевского).

**ФЕМТОСЕКУНДНЫЙ ЛАЗЕРНЫЙ СИНТЕЗ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ
УГЛЕРОДНЫХ ТОЧЕК ИЗ ПРОТЕИНОГЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ**

**Femtosecond laser synthesis of fluorescent carbon dots from
proteinogenic amino acids**

*Артём Астафьев**, Александр Шахов, Мария Сырчина,
Александр Тиховребов, Виктор Надточенко^{1*}

Федеральный Исследовательский Центр Химической Физики РАН
им. Н.Н. Семенова

*e-mail: astafiev.artiom@gmail.com, тел. +7 916 9427027

Формирование флуоресцентных продуктов в материале живых клеток и тканей *in situ* при фемтосекундном лазерном облучении является новым подходом к флуоресцентной микроскопии биообъектов, позволяющим достичь быстрого, локального, направленного и неинвазивного флуоресцентного мечения участков внутриклеточного материала [1-2]. Механизмы и исходные вещества подобных лазерно-индуцированных реакций остаются не до конца изученными, однако ряд данных указывает на возможность формирования флуоресцентных наночастиц (углеродных точек) из биомолекул при фемтосекундном лазерном облучении [2]. Мы исследовали лазерно-индуцированные химические превращения одного из наиболее распространенных типов биомолекул – стандартных аминокислот в качестве процесса, моделирующего формирование флуоресцентных продуктов во внутриклеточном материале. Под действием сфокусированного излучения фемтосекундных лазерных импульсов в водных растворах аминокислот происходит синтез флуоресцентных углеродных точек с характерными диаметрами в единицы нанометров. При этом наличие у аминокислот полярной боковой групп повышает скорость лазерного синтеза. Анализ химического состава и строения показывает, что углеродные точки формируются при полимеризации аминокислот и последующем окислении и частичной карбонизации полимерных наночастиц. Углеродные точки, синтезированные из ряда аминокислот с полярной и неполярной боковой цепью, проявляют схожие оптические свойства: широкий спектр поглощения без выраженных пиков в ультрафиолетовом и видимом диапазонах, видимая флуоресценция со спектром излучения, зависящим от длины волны возбуждения с максимумом интенсивности в синей области спектра. Детальное исследование флуоресцентных свойств указывает на общий механизм видимой флуоресценции точек,

полученных из различных аминокислот, схожий с механизмом люминесценции, возникающей при агрегации полипептидов [3]. Благодаря монотонной зависимости интенсивности и времен жизни флуоресценции от кислотности водного раствора в широком диапазоне pH возможно их использование в качестве флуоресцентного pH-индикатора.

В целом наши результаты показывают, что синтез углеродных утолчек из аминокислот и пептидов является возможным механизмом лазерно-индуцированного образования флуоресцентных продуктов во внутриклеточном материале.

Работа была поддержана Российским Научным Фондом (грант №21-72-20169)

1. Sun Q., Qin Z., Wu W., Lin Y., Chen C., He S., Li X., Wu Z., Luo Y., Qu J., In vivo imaging-guided microsurgery based on femtosecond laser produced new fluorescent compounds in biological tissues, *Biomedical Optics Express*. 9 (2018) 581-590.
2. Astafiev A.A., Shakhov A.M., Osychenko A.A., Syrchina M. S., Karmenyan A.V., Tochilo U.A., Nadochenko V.A. Probing intracellular dynamics using fluorescent carbon dots produced by femtosecond laser in situ, *ACS Omega*. 5 (21) (2020) 12527-12538.
3. Zhang Z., Yan W., Dang D., Zhang H., Sun J.Z., Tang B.Z. The role of amide (n, π^*) transitions in polypeptide clusteroluminescence, *Cell Reports Physical Science* 3 (2022), 100716

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НАНОСТРУКТУР
СЕРЕБРА И ЗОЛОТА КАК НАНОСЕНСОРОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ БИОМОЛЕКУЛ**

**A joint experimental and theoretical study of silver and gold nanostructures as
nanosensors for the detection of biomolecules**

Андрей Буглак, Томаши Сыч, Алексей Кононов*

Санкт-Петербургский государственный университет

*e-mail: andreybuglak@gmail.com, тел. +7 977 3440871

В последние годы биополимерные матрицы активно используются для синтеза кластеров серебра и золота. Чувствительность кластеров к молекулярному окружению открывают возможности их применения для детекции различных аналитов в растворе. Мы исследовали физико-химические свойства и фотонику металлических наночастиц и нанокластеров. Последние обладают интенсивной люминесценцией и способны менять свои оптические свойства вместе с изменением окружения, что позволяет использовать их для детекции различных биомаркеров.

Так, установлен механизм сенсорной активности кластеров серебра на ДНК, используемый для детекции определенных последовательностей нуклеиновых кислот. Кроме того, продемонстрирована возможность использования и белковых матриц для синтеза кластеров. Так, нами успешно получены кластеры на сывороточном альбумине и иммуноглобулинах [1]. Данные кластеры можно использовать в качестве люминесцентных сенсоров белков.

Для понимания природы взаимодействия кластеров и биополимерных матриц проведено моделирование *in vitro* и *in silico* взаимодействий кластеров и низкомолекулярных соединений: азотистых оснований и аминокислот. Показано, что цистеин наиболее активно вступает в реакцию с серебром и золотом и, как следствие, цистеиновые остатки в составе белков стабилизируют кластеры в белковых матрицах. Помимо цистеина и других тиолов благородные металлы активно взаимодействуют с депротонированными тирозином, глутаминовой и аспарагиновой кислотами. При этом энергия взаимодействия аминокислот и серебра/золота выше, чем энергия взаимодействия серебра/золота и азотистых оснований, что свидетельствует о различном характере связи металлов с белками и нуклеиновыми кислотами.

Также взаимодействие кластеров с низкомолекулярными лигандами важно было исследовать с точки зрения детекции последних.

Для этого подробно исследованы комплексы серебра и ДОФА [2], комплексы золота и птерина [3]. Показано, что возможна детекция данных анализов как на основании колориметрии и флуоресцентной спектроскопии, так и с применением Рамановского рассеяния.

Работа поддержана Российским Научным Фондом, грант № 20-73-10029.

1. Sych, T.S. *et al.* (2023) Quantitative determination of albumin and immunoglobulin in human serum using gold nanoclusters. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 298, 122796
2. Reveguk, Z. V *et al.* (2023) Rapid and Selective Colorimetric Determination of L-DOPA in Human serum with Silver Nanoparticles. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* DOI: 10.1016/j.saa.2023.122810
3. Chebotaev, P.P. *et al.* (2023) Pterin interactions with gold clusters: A theoretical study. *Dye. Pigment.* DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2023.111323>

**КОМБИНИРОВАННАЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ И ПЛАЗМОННАЯ
ФОТОТЕРМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ В МОДЕЛИ КРЫС
С ПЕРЕВИТЫМИ ОПУХОЛЯМИ**

**Combined photodynamic and plasmonic photothermal therapy in rat model with
transplanted tumors**

Алла Бучарская^{1,2,3}, Никита Наволокин^{1,2}, Дмитрий Мудрак¹,
Галина Маслякова^{1,2}, Борис Хлебцов⁴, Николай Хлебцов^{2,4}, Вадим Генин^{2,3},
Элина Генина^{2,3}, Валерий Тучин^{2,3}*

¹СГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России,
410012 Саратов, ул. Б. Казачья, д.112

²СГУ им. Н.Г. Чернышевского, 410012 Саратов, ул. Астраханская, д. 83

³Томский государственный университет, 634050 Томск, пр. Ленина, 36

⁴ИБФРМ РАН, 410049 Саратов, пр. Энтузиастов, д.13

**e-mail: allaalla_72@mail.ru, тел. +7 905 3850895*

Актуальность разработки инновационных методов терапии в онкологии на основе комбинированных технологий фотодинамической терапии (ФДТ) и плазмонной фототермической терапии (ПФТ) обусловлена недостаточной эффективностью стандартных видов терапии для лечения опухолей труднодоступных локализаций.

Целью исследования была разработка комбинированной технологии ФДТ и ПФТ терапии (ФДТ) у крыс с перевитой холангиокарциномой РС-1.

Крысам с перевитой холангиокарциномой РС-1 при достижении опухолью объема $3\pm 0,3$ см³, проводили комбинированную ФДТ и ПФТ терапию. В качестве фотосенсибилизатора использовали индоцианин зеленый, который разводили в полиэтиленгликоле (ПЭГ) в соотношении 1:100 и вводили крысам внутритуморально в дозе 2 мг/кг. Для ПФТ внутритуморально вводили золотые наностержни (ЗНС), функционализированные ПЭГ, в концентрации 400 мкг/мл в объеме 30% от объема опухоли. Через час после инъекций опухоль облучали чрескожно диодным инфракрасным лазером 808 нм LS-2-N-808-10000 (Россия) при плотности мощности 2,3 Вт/см² в течение 15 мин. Температуру локального нагрева опухоли измеряли тепловизором IRYSYS 4010 (UK). Вывод животных и отбор образцов тканей опухоли для гистологического исследования проводили через 72 ч и на 21 день после

комбинированной терапии. Морфологические исследования ткани опухоли проводили на срезах опухоли, окрашенных стандартными методами и при иммуногистохимическом окрашивании на маркер пролиферации Ki-67 и маркер апоптоза Вах.

При проведении комбинированной ПФТ и ФДТ терапии отмечали выраженный подъем температуры локального нагрева опухоли, вплоть до $60 \pm 4,1^\circ \text{C}$, после проведения терапии наблюдали на коже в области воздействия лазера появление ожоговой поверхности коричневатого цвета. Через 72 часа наблюдали выраженные некротические изменения в опухолевой ткани, поля некроза занимали до 80% площади. Сохранные опухолевые клетки наблюдали только на периферии опухоли, в них отмечали снижение экспрессии маркера пролиферации и повышение экспрессии маркера апоптоза. Через 3 недели отмечали значительное торможение роста опухолей, ИТРО по массе опухоли составил 77,4 %.

Предложенная технология комбинированной ФДТ и ПФТ терапии вызывает выраженное повреждение опухолевой ткани у крыс с перевитой холангиокарциномой.

Работа была выполнена при поддержке Программы развития СГУ им. Н.Г. Чернышевского (Приоритет-2030) и СГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России (перспективный проект № SSMU-2022-002).

**ВРЕМЯ-РАЗРЕШЕННАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ NAD(P)H В СМЕСИ
ЕСТЕСТВЕННЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ КОМПЛЕКСОВ**

**Time-resolved fluorescence of NAD(P)H in a mixture of natural
fluorescent enzymes**

Иоанна Горбунова^{1}, Дмитрий Яшков², Денис Волков², Максим Сасин¹,
Алексей Ведяйкин², Андрей Никифоров³, Олег Васютинский¹*

¹Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе

²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого

³Институт цитологии Российской академии наук

**e-mail: i.gorbunova@mail.ioffe.ru, тел. +7 967 9672391*

В настоящее время активно проводятся исследования время-разрешенной флуоресценции естественных внутриклеточных флуорофоров NADH, NADPH, и FAD. Однако существует проблема разделения сигналов флуоресценции этих коферментов при исследовании живых клеток, поскольку спектры их возбуждения и флуоресценции перекрываются, что приводит к трудностям при анализе экспериментальных данных, полученных методом FLIM. [1] В докладе будут представлены результаты комплексного исследования состава и флуоресцентных свойств комплекса NADH-алкогольдегидрогеназа (ADH) в смеси естественных ферментативных комплексов. Исследования проводились с помощью биохимических и оптических методов: многофотонная флуоресцентная время-разрешенная спектроскопия, гель-электрофорез, жидкостная хроматография и масс-спектрометрия. Было обнаружено, что исследуемый реагент содержит ряд природных флуоресцентных комплексов: NAD(P)H, NADH-ADH, NADPH-IDH и PLP-SHMT. В частности, было показано, что комплексы NADH-ADH и NADPH-IDH не могут быть разделены флуоресцентными методами. Кроме того, был обнаружен естественный флуоресцентный комплекс PLP-SHMT, флуоресценцию которого можно отделить от связанного с ферментом NAD(P)H с помощью оптических фильтров, но который эффективно маскировал вклад флуоресценции связанного с ферментом FAD [2]. Полученные результаты продемонстрировали потенциал и ограничения метода FLIM для задач разделения свободных и связанных с ферментами NADH, NADPH и FAD. Было показано, что флуоресценцию комплекса PLP-SHMT можно отделить от связанных с ферментом

NAD(P)H и FAD путем анализа коротких времен затухания флуоресценции, составляющих около десятка пикосекунд. Однако было обнаружено, что этот анализ эффективен только при относительно высоком числе фотонов в регистрируемых сигналах флуоресценции. Результаты, полученные в этом исследовании, могут быть использованы для определения внутриклеточного соотношения NADH/FAD методом FLIM.

Работа была поддержана Российским научным фондом (грант № 23-22-00230).

1. Leben, R.; Köhler, M.; Radbruch, H.; Hauser, A.E.; Niesner, R.A. Systematic enzyme mapping of cellular metabolism by phasor-analyzed label-free NAD(P)H fluorescence lifetime imaging. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 5565.
2. Ahmed, S.A.; McPhie, P.; Miles, E.W. A thermally induced reversible conformational transition of the tryptophan synthase $\beta 2$ subunit probed by the spectroscopic properties of pyridoxal phosphate and by enzymatic activity. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 8612–8617.

**ПОДХОДЫ К ФОТОРЕГУЛИРУЕМОМУ НАПРАВЛЕННОМУ РАСЩЕПЛЕНИЮ
ДНК НУКЛЕАЗОЙ CAS9 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ФОТОМОДИФИЦИРОВАННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ**

**The approaches for photoregulated targeted cleavage of DNA by nuclease Cas9
with the application of photomodified oligonucleotides**

Е.С. Горленко^{1,2}, Л.В. Саковина^{1,2}, Е.В. Иванская^{1,2}, Д.С. Новопашина^{1,2}*

¹Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия
²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

**e-mail: danov@niboch.nsc.ru, тел. +7 903 9040876*

Введение фоточувствительных компонентов в состав конструкций на основе олигонуклеотидов является перспективным подходом к созданию молекулярно-биологических систем с регулируемой активностью. Такие конструкции можно "включать" и/или "выключать" в определенное время и в определенном месте, облучая их светом определенной длины волны. С одной стороны, их можно активировать или дезактивировать под воздействием света за счет удаления фотоблокирующей группы или расщепления фотолинкера. С другой стороны, с помощью облучения можно изменить пространственную структуру модифицированного биополимера и таким образом повлиять на его функциональную активность.

Целью работы является разработка подходов к фоторегулируемому расщеплению ДНК нуклеазой Cas9 с использованием фотомодифицированных направляющих РНК и комплементарных ей блокирующих олигонуклеотидов.

Синтез модифицированных фоточувствительных олигонуклеотидов осуществляли твердофазным фосфитамидным методом с использованием фотолинкеров на основе производных азобензола (Q), а также специально полученного фосфитамида на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола (PL). Для создания циклических олигонуклеотидов проводили реакцию азид-алкинового циклоприсоединения в присутствии Cu(I). Линеаризацию циклических фоторасщепляемых олигонуклеотидов, содержащих PL, проводили с использованием УФ-облучения (365 нм). Для изменения пространственной структуры направляющих РНК за счет обратимого изменения конформации фотолинкеров Q образцы облучали

светом длиной волны 380 нм (цис) и 505 нм (транс). Для проверки эффективности действия использовали плазмидную ДНК-мишень, содержащую протоспейсер, комплементарный направляющей РНК, и мотив РАМ.

«Включение» системы осуществляли с использованием циклических фоторасщепляемых направляющих сгРНК. В результате УФ-облучения сгРНК линейризуется, что приводит к активации системы и расщеплению плазмидной ДНК. Для «выключения» системы разработаны циклические блокирующие олигонуклеотиды, имеющие в составе один или два РL. При их использовании наблюдали уменьшение эффективности расщепления ДНК после облучения за счет линейризации и связывания с направляющей сгРНК, приводящего к блокированию действия системы. Также был исследован подход обратимой регуляции системы. Для этого направляющие сгРНК, содержащие различные варианты фотолинкеров Q, облучали светом длинами волн 505 нм для активации работы системы за счет принятия линкером транс-конформации и 380 нм для ее дезактивации при переходе в цис-форму. Было показано уменьшение эффективности расщепления при увеличении числа линкеров в составе сгРНК.

Полученные результаты подтверждают перспективность предложенных подходов к использованию фоточувствительных линейных и циклических олигонуклеотидов в составе системы редактирования генома CRISPR/Cas9 для регуляции активности расщепления плазмидной ДНК.

Работа была поддержана Российским научным фондом (грант РНФ № 22-14-00294).

ОПЫТ *IN VIVO* ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ И КОМПЬЮТЕРНОЙ ТОМОГРАФИИ С НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА В КАЧЕСТВЕ КОНТРАСТНОГО АГЕНТА

In vivo fluorescence and computed tomography with gold nanoparticles as a contrast agent

Андрей И. Деменьшин^{1*}, Мария С. Истомина^{2,3}, Елена В. Соловьева¹

¹Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет

²ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России

³Санкт-Петербургский государственный электротехнический
университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина)

**e-mail*: st087334@student.spbu.ru, тел. +7 953 6028563

Золотые наночастицы являются перспективным материалом тераностики благодаря своим оптическим свойствам. Для них наблюдается явление локализованного поверхностного плазмонного резонанса (ЛППР), позволяющее значительно усилить сигнал флуоресценции и комбинационного рассеяния (КР) адсорбированных молекул. Эффект ЛППР также отвечает за высокую теплоотдачу плазмонных частиц, что в практических целях открывает возможность для реализации гипертермальной терапии злокачественных образований [1]. Классические контрастные агенты томографии, как правило, способны работать лишь в одномодовом режиме: флуоресценция, компьютерная томография, магнитно-резонансная томография. Композиционные наноматериалы со структурой ядро-оболочка, в которых ядром является наноразмерное золото, способны функционировать в нескольких режимах биовизуализации [2]. В связи с этим, задачей настоящей работы стало получение и *in-vivo* апробация мультимодальных контрастов на основе наночастиц золота, для которых возможно получение КТ сигнала от металлического ядра наравне с сигналом эмиссии и усиленным КР спектром от красителя.

На синтетическом этапе работы получено два типа биометок на основе золотых наночастиц стержневидной формы и красителей цианин 5.5 амина и цианин 7 амина, настроенные на красную и ближнюю инфракрасную область электромагнитного спектра, соответственно. Проведённые с их использованием *in vivo* эксперименты на лабораторных мышках линии ICR (CD-1) наглядно продемонстрировали возможность работы в бимодальном режиме флуоресцентная-компьютерная

томография. Исследуемые биометки также позволили оценить их естественное распределение двумя независимыми методами: флуоресцентным сканированием и путем регистрации КР спектров красителя с отдельных органов.

Работа поддержана СПбГУ и Российским научным фондом (грант №22-73-10052). Авторы благодарят ресурсные центры Научного парка: «Оптические и лазерные методы исследования вещества», «Методы анализа состава вещества», «Нанотехнологии».

1. B. Andreiuk et al. Design and synthesis of gold nanostars-based SERS nanotags for bioimaging applications // *Nanotheranostics*. 2022. Vol.6, №1. P.10-30.
2. Zhang W. et al. Dual-Targeted Gold Nanoprism for Recognition of Early Apoptosis, Dual-Model Imaging and Precise Cancer Photothermal Therapy // *Theranostics*. Ivyspring International Publisher, 2019. Vol. 9, № 19. P. 5610–5625.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ НАКОПЛЕНИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА
РАДАХЛОРИН В КЛЕТКАХ С ПОМОЩЬЮ ВРЕМЯ-РАЗРЕШЕННОЙ
ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ**

**Investigation of photosensitizer Radachlorin accumulation in cells by means of
fluorescence-lifetime imaging microscopy**

А.А. Жихорева^{1}, А.В. Белаиов¹, П.С. Буторин¹, Т.Н. Беляева²,
А.В. Салова², Е.С. Корнилова², И.В. Семенова¹, О.С. Васютинский¹*

¹ФТИ им. А.Ф. Иоффе, Санкт-Петербург, Россия

²Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург,
Россия

**e-mail: anna_zhikhoreva@mail.ru, тел. +7 950 0193618*

Радахлорин является фотосенсибилизатором (ФС) второго поколения, который применяется для фотодинамической терапии онкологических заболеваний в России и за рубежом[1]. Основным направлением исследований Радахлорина является изучение его влияния на клетки и ткани как реагента, способного в ходе фотодинамического воздействия генерировать активные формы кислорода. Однако параметры флуоресценции флуорофоров позволяют определять свойства микроокружения, что может быть использовано для улучшения подбора дозы терапии с учетом индивидуальных особенностей пациента и типа опухоли[2]. Таким образом, исследование характеристик флуоресценции Радахлорина в различных условиях является актуальной задачей.

В данной работе представлено исследование флуоресценции ФС Радахлорин с временным разрешением в растворах разной кислотности, вязкости и полярности, а также в живых клетках линии HeLa, A549 и 3T3 при разных временах их инкубации в растворе ФС. Исследование параметров флуоресценции ФС в растворах и клетках проводилось с помощью флуоресцентной микроскопии с временным разрешением на микроскопе Ti-2A (Nikon), оснащенный конфокальным сканирующим модулем DCS-120 (Becker&Hickl) счета одиночных фотонов с корреляцией по времени. Анализ время-разрешенных сигналов флуоресценции проводился с помощью программы SPCImage, позволяющей проводить подгонку сигналов экспоненциальными функциями, а также представлять экспериментальные данные в виде phasor-plot.

Были определены зависимости относительного квантового выхода и времени жизни флуоресценции ФС от кислотности, вязкости и

полярности растворов. Полученные результаты были использованы для анализа внутриклеточной локализации и определения свойств микроокружения в живых клетках линии HeLa, где наблюдалась сильная корреляция между изменениями времени жизни флуоресценции ФС и различиями в значениях pH во внутриклеточных структурах. Кроме того, исследование Радахлорина показало изменение времени жизни флуоресценции ФС на разных этапах его накопления в клетках. Наибольшее время жизни флуоресценции Радахлорина составляло 5,5 нс и наблюдалось на мембране при малых временах инкубации. В процессе проникновения ФС время жизни составляло 4,7 нс в везикулах, 4,3 нс - в лизосомах и 4,9 нс - в цитоплазме. Анализ время-разрешенных сигналов флуоресценции Радахлорина в клетках на разных этапах накопления с помощью phasor-plot позволил разработать алгоритм сегментации разных областей клеток (мембрана, везикулы, цитоплазма и лизосомы). Результат работы алгоритма хорошо согласуется с контрольными экспериментами с использованием стандартных флуоресцентных маркеров.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 21-72-10044).

1. Triesscheijn, Martijn, et al. *The oncologist*. 2006. 11(9). 1034-1044.
2. Reshetov, V.A., et al. *Journal of Applied Spectroscopy* 78 (2011): 103-109.

ФЕМТОСЕКУНДНЫЙ ЛАЗЕРНЫЙ СКАЛЬПЕЛЬ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ СЛИЯНИЯ КЛЕТОК

Femtosecond laser scalpel as a tool for cell fusion

А.Д. Залесский^{1}, А.А. Осыченко¹, Ю.А. Федотов², В.А. Надточенко²*

¹ФГБУН ФИЦ ХФ РАН, Москва, РФ Организация

²ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, РФ

* e-mail: aleksandr.zaleskij@phystech.edu

Фемтосекундные лазеры все чаще используется в различных областях биологии и медицины. Взаимодействие фемтосекундного лазерного излучения ближнего ИК-диапазона (700-1000 нм) с биологическим материалом клетки носит сложный, нелинейный характер. В общем случае мощность поглощённого излучения можно описать следующим соотношением:

$$P = \sigma_1 I^1 + \dots + \sigma_n I^n + \dots,$$

где n – степень нелинейности процесса, которая показывает число одновременно поглощённых фотонов лазерного излучения ($\sigma_1 \gg \sigma_2 \gg \dots \gg \sigma_n \gg \dots$).

В процессе поглощения фемтосекундного лазерного излучения биоматериал может претерпевать химические превращения, что зачастую приводит к изменению оптических свойств и изменению степени нелинейности поглощения вплоть до 1, т.е. процесс поглощения становится линейным по интенсивности лазерного излучения. В силу того, что плотность биоматериала клетки существенно неоднородна, величина поглощённой энергии фемтосекундного лазерного излучения носит случайный характер. Это приводит к сложности контролировать процесс деструкции биоматериала.

Один из подходов повышения степени контроля фемтосекундной лазерной хирургии является использование специфичных по локализации светопоглощающих агентов. В качестве таких агентов могут выступать флуоресцентные красители, квантовые точки, наночастицы и т.д.

За счёт такого подхода удаётся:

- 1) снизить порог интенсивности лазерного излучения для деструкции выбранной структуры клетки;
- 2) повысить степень локализации воздействия, так как пониженная интенсивность излучения с меньшей вероятностью поглощается неокрашенным материалом клетки.

Эффективность такого подхода продемонстрирована нами в работе по энуклеации ооцитов мыши при помощи фемтосекундного лазерного излучения. В настоящей работе мы хотели бы продемонстрировать ещё одну возможность контролирования процесса деструкции биологического материала за счёт особенности спектра поглощения флуоресцентного красителя. Современные источники фемтосекундного лазерного излучения позволяют перестраивать длину волны в значительном диапазоне (690-1000 нм). Видно, что σ линейно влияет на величину поглощённой мощности лазерного излучения и, следовательно, влияние изменения длины волны лазера на величину поглощённой мощности носит более плавный характер (сообразный спектру поглощения флуоресцентного красителя).

В данной работе объектом воздействия являлись двухклеточные эмбрионы мыши. Задача состояла в лазерном слиянии бластомеров эмбриона за счёт локализованного разрушения общего участка мембран бластомеров. В качестве светопоглощающего агента использовался флуоресцентный краситель (BioTracker Blue, Sigma Aldrich, USA), окрашивающий мембраны клеток. Использование флуоресцентного красителя в этом случае понижало пороговую интенсивность лазерного излучения, необходимую для разрушения мембраны клетки. После воздействия фиксировалось четыре возможных результата:

- 1) наблюдалось слияние бластомеров;
- 2) разрушался один бластомер;
- 3) разрушалось два бластомера;
- 4) не наблюдалось изменения состояния эмбриона (не наблюдалось слияния и оба эмбриона оставались целы).

Для демонстрации влияния длины волны лазерного излучения на процесс деструкции биологического материала параметры воздействия, такие как энергия фемтосекундного импульса и длительность экспозиции, фиксировались и изменялась только длина волны.

Исследована эффективность проведения процедуры лазерного слияния клеток в зависимости от присутствия флуоресцентного красителя, длины волны фемтосекундного лазерного излучения, энергии импульса, частоты следования импульсов. Продemonстрирована способность управлять долей поглощённого фемтосекундного лазерного излучения за счёт спектральных особенностей используемого флуоресцентного красителя.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 21-75-10155.
Работа выполнена на ЦКП № 506694 ФИЦ ХФ РАН и УНУ № 1440743.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СВЕРХБЫСТРОЙ
ДИНАМИКИ ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ ТЕТРАГИДРОБИОПТЕРИНА**

A joint experimental and theoretical study of ultrafast excited states dynamics of tetrahydrobiopterin

*Варвара Кубенко, Владимир Помогаев, Андрей Буглак, Алексей Кононов**

Санкт-Петербургский государственный университет

**e-mail: alexei.i.kononov@gmail.com, тел. +7 812 4289971*

Тетрагидробиоптерин (Н₄Бип) является кофактором для нескольких ключевых ферментов, имеющих центральное метаболическое значение. Н₄Бип принимает участие в качестве донора электронов в активности NO-синтазы, в качестве восстановителя в реакциях, катализируемых алкилглицеролмонооксигеназой и гидроксилазами ароматических кислот (фенилаланин, тирозин, триптофан). Фотофизические свойства его практически не исследованы. Отчасти это связано с тем обстоятельством, что он подвержен быстрому окислению на воздухе с образованием различных форм. Мы подробно исследовали как спектры поглощения и стационарной люминесценции, так и динамику электронно-возбужденных состояний Н₄Бип на фемтосекундной временной шкале в зависимости от условий приготовления образца, буферов и pH раствора.

Кинетика нейтральной восстановленной формы Н₄Бип обнаруживает мультиэкспоненциальный характер с временными составляющими в диапазоне 100 фс-2пс. Результат указывает на чрезвычайно быстрый процесс внутренней конверсии, приводящий к распаду S₁ состояния. Экспериментальные данные сравниваются с результатами, полученными методом неадиабатической динамики возбужденных состояний.

Работа поддержана Российским Научным Фондом, грант № 20-73-10029.

**spFRET-МИКРОСКОПИЯ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
ПЕРСПЕКТИВНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ
С НУКЛЕОСОМАМИ**

**spFRET studies of the interaction of promising anticancer compounds
with nucleosomes**

Н.В. Малюченко^{1}, Т.В. Андреева¹, П. Черникова¹,
В.М. Студитский^{1,2}, А.В. Феофанов^{1,3}*

¹Биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова

²Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA

³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

**e-mail: mal_nat@mail.ru, тел. +7 916 4439114*

Нуклеосома – структурно-функциональная и регуляторная единица хроматина в эукариотическом геноме, состоящая из участка ДНК длиной 145-147 п.н., обёрнутого вокруг октамера гистонов [1,2]. Нуклеосомы могут быть реконструированы с использованием нуклеосом-позиционирующих ДНК-матриц и набора коровых гистонов [3] и позволяют изучать *in vitro* сложные процессы, происходящие в хроматине, в частности, транскрипцию, а также взаимодействия с архитектурными белками и регуляторными факторами [4-6]. Введение флуоресцентных меток Су3 и Су5, образующих донор-акцепторную пару, в состав нуклеосомной ДНК предоставляет уникальную возможность исследования изменений структуры нуклеосомных наночастиц под действием различных факторов с помощью флуоресцентной микроскопии одиночных частиц на основе Фёрстеровского резонансного переноса энергии (spFRET-микроскопии). Нами был создан ряд флуоресцентных нуклеосом, меченых в различных областях ДНК, что позволяет определить локализацию и масштаб структурных перестроек, происходящих в нуклеосомах. Методом spFRET микроскопии были исследованы взаимодействия нуклеосом с полифенолами растений, обладающими ДНК-тропной активностью, а также с синтетическими ингибиторами фермента PARP1. Эти исследования позволили предложить новый метод изучения эффективности траппинга PARP1 в хроматине под действием ингибиторов PARP1. Траппинг (образование непродуктивных комплексов) белков на хроматине создает препятствия для нормального протекания ядерных процессов, таких как транскрипция и прохождение репликационной вилки, что в конечном итоге, усиливает

противоопухолевое действие ингибиторов. Изучение действия полифенолов на нуклеосомы с применением spFRET анализа показало, что некоторые из них, такие как галлат эпигаллокатехина и кверцетин дестабилизируют структуру нуклеосом, в то время как, ресвератрол, генистеин и кемпферол не вызывают значительных изменений в структуре нуклеосом. Изучено модулирующее действие ряда полифенолов на комплексы нуклеосом с хроматин-связывающими белками PARP1 и FАСТ.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 19-74-20018 с использованием инфраструктурных возможностей ЦКП ИБХ 2020.

1. Richmond T.J. et al. // *Nature*. 1984. V. 311. N.5986. P. 532-537.
2. Luger K., et al. // *Nature*. 1997. V. 389. N.6648. P. 251-260.
3. Gaykalova D.A. et al. // *Methods Mol. Biol.* 2009. V. 523. P. 109-123.
4. Kotova E.Y. et al // *Int J Mol Sci.* 2022. V. 23. N.13.
5. Kantidze O.L. et al. // *Nat Commun.* 2019. V. 10. N.1. P. 1441.
6. Chang H.W. et al. // *Cells.* 2022. V. 11. N.16.

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ЛАЗЕРНОЙ НАНОХИРУРГИИ ДЛЯ СЛИЯНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Laser nanosurgery methodic for somatic cell fusion

*Д.Ю. Мартиросян, А.А. Осыченко¹, А.Д. Залесский¹,
У.А. Точило¹, В.А. Надточенко¹*

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр химической физики
им. Н.Н. Семёнова РАН

Известно, что в фармацевтике и фундаментальной науке в качестве объектов исследования используются модельные организмы. Фемтосекундная лазерная нанохирургия может быть успешно применима для их создания. Данный метод позволяет проводить неинвазивные микроманипуляции с отдельными органеллами внутри живой клетки [1-3]. Метод позволяет проводить операции по клонированию животных организмов только с помощью света и существенно сокращает время и сложность работы. При фокусировке фемтосекундных лазерных импульсов объективом с большой числовой апертурой ($NA > 0.8$) в биологическом материале создается интенсивность излучения, достаточная для индуцирования многофотонной ионизации в суб-фемтолитровом объёме [4]. Комбинированный эффект многофотонной и ударной ионизации создаёт большую плотность свободных электронов, приводящую к абляции биологических тканей с размерами надрезов менее 100 нм [5].

В данной работе предлагается усовершенствованный метод слияния клеток с помощью фемтосекундного лазерного излучения ближнего ИК диапазона. Предложенная методика повышает степень контроля воздействия фемтосекундного лазерного излучения на клетки. За счет эффектов нелинейного поглощения фемтосекундного лазерного излучения удастся минимизировать основные разрушающие эффекты воздействия: нагрев и кипение, которые проявляются в виде парогазового пузыря. Ранее проведенные исследования [6] показали высокую значимость и перспективу данного направления.

Работа была поддержана грантом РФФ № № 21-75-10155.

1. Shimada T., Watanabe W., Matsunaga S., Higashi T., Ishii H., Fukui K., Isobe K., Itoh K., *Intracellular disruption of mitochondria in a living HeLa cell with a 76-MHz femtosecond laser oscillator*. Optics Express, 2005. **13**(24): p. 9869-9880.
2. Wakida N.M., Lee C.S., Botvinick E.T., Shi L.Z., Dvornikov A., Berns M.W., *Laser nanosurgery of single microtubules reveals location-dependent depolymerization rates*. Journal of Biomedical Optics, 2007. **12**(2).
3. Uchugonova A., Lessel M., Nietzsche S., Zeitz C., Jacobs K., Lemke C., Koenig K., *Nanosurgery of cells and chromosomes using near-infrared twelve-femtosecond laser pulses*. Journal of Biomedical Optics, 2012. **17**(10).
4. А.А. Осыченко, У.А. Точило, А.А. Астафьев, А.Д. Залесский, А.М. Шахов, А.С. Кривохарченко, Надточенко В.А., *Определение диапазона неинвазивного воздействия фемтосекундными лазерными импульсами ближнего инфракрасного спектра для нанохирургии ооцитов млекопитающих*. Современные технологии в медицине, 2017. **9**(1): p. 21-27.
5. K. Kuetemeyer, R. Rezgüi, H. Lubatschowski, Heisterkamp A., *Mechanisms of femtosecond laser cell surgery in the low-density plasma regime*, in *Optical Interactions with Tissue and Cells Xxii*, E.D. Jansen and R.J. Thomas, Editors. 2011.
6. А. М. Шахов, А.А.А., А. А. Осыченко, В. А. Надточенко, *Воздействие фемтосекундного лазерного излучения на ооциты млекопитающих*. Химическая физика, 2016. **35**(10): p. 1-4.

**МЕТОДЫ ФЕМТОСЕКУНДНОЙ ЛАЗЕРНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ В
ИССЛЕДОВАНИИ ПЕРВИЧНЫХ ПРОЦЕССОВ ФОТОСИНТЕЗА**

**Methods of femtosecond laser spectroscopy in the study of the primary processes
of photosynthesis**

В.А. Надточенко^{1}, А.В. Айбуш¹, И.В. Шелаев¹, Ф.Е. Гостев¹,
А.Ю. Семенов^{1,2}, Д.А. Черепанов^{1,2}*

¹ФИЦ «Химическая физика» им. Н.Н. Семенова РАН, Косыгина 4,
117977, Москва

²НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова,
Ленинские горы 1, стр.40 119992, Москва

**e-mail: nadtochenko@gmail.com, тел. +7 915 2269347*

В последние сорок лет значительный прогресс был достигнут в развитии методов лазерной спектроскопии и их применения в химии и биологии. Особое место в этом направлении приобрели методы лазерной спектроскопии с использованием фемтосекундных лазеров. Методы фемтосекундной спектроскопии опираются на значительные достижения в развитии лазерной техники и технологии получения сверхкоротких световых импульсов, а также теоретическом развитии фундаментальных физических основ нелинейной оптики.

Цель данной работы дать для неспециалистов в области нелинейной оптики и физики лазеров описание методов фемтосекундной лазерной спектроскопии в исследовании биологических систем, и в частности, их приложение для исследования первичных процессов фотосинтеза.

В докладе обсуждаются возможности таких методов фемтосекундной лазерной спектроскопии как:

- возбуждение-зондирование,
- 4-х волновое смешение в реализации лазер-индуцированных дифракционных решеток
- 2D электронная фемтосекундная спектроскопия.

В докладе дан краткий обзор математических методов анализа и интерпретации данных, полученных с помощью фемтосекундной лазерной спектроскопии.

Работа выполнена при поддержке фонда РФФ № 22-24-00705.

**ДЕСТРУКЦИЯ МЕТАФАЗНОЙ ПЛАСТИНКИ В ООЦИТАХ МЫШИ С
 ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

Metaphase plate destruction in mouse oocytes using femtosecond laser radiation

*Алина Осыченко**, Александр Залесский, Давид Мартиросян,
 Ульяна Точило, Виктор Надточенко

ФИЦ ХФ РАН

*e-mail: alina.chemphys@gmail.com, тел. +7 985 2293375

Получение реципиентного цитопласта – яйцеклетки, не содержащей ДНК – актуальная задача для современной биомедицины. Реципиентный цитопласт используется для переноса ядер соматических клеток (клонирования) у животных и для реализации метода цитоплазматической замены (получения «детей от трех родителей») – на ооцитах человека. В настоящее время реципиентный цитопласт получают единственным способом – путем аспирации ДНК из ооцитов при помощи микроиглы, и этот процесс называют энуклеацией. Наш коллектив осуществляет разработку метода энуклеации ооцитов при помощи фемтосекундного лазерного излучения ближнего ИК диапазона (800 нм). Ранее нами показано, что при использовании флуоресцентного окрашивания на ДНК (краситель Hoechst 33342) можно успешно детектировать метафазную пластинку и затем с высокой точностью ее разрушить при помощи фемтосекундного лазера.

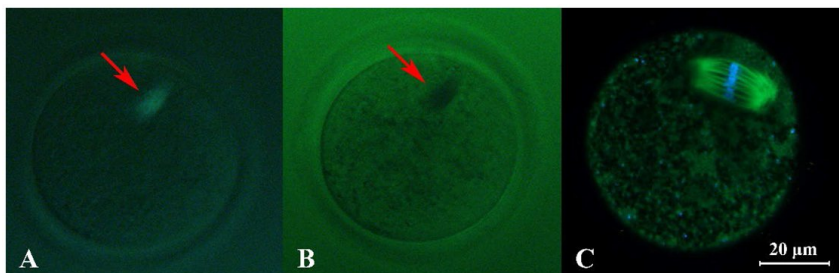


Рисунок 1. А, В – визуализация веретена деления в ооцитах мыши на стадии метафазы II при помощи поляризованного света, С – конфокальное изображения веретена деления (зеленый цвет – микротрубочки, синий – метафазная пластинка).

В данной работе будут представлены наши последние результаты по лазерной энуклеации. Нам удалось совместить метод поляризационной микроскопии (Рисунок 1) – для визуализации веретена деления без окрашивания – и фемтосекундной лазерной энуклеации. В поляризованном свете видно именно веретено деления (микротрубочки), а не метафазную пластинку (Рисунок 1). На стадии метафазы II эти структуры ассоциированы друг с другом, поэтому облучение зоны веретена деления фемтосекундным лазерным излучением приводило к энуклеации. Мы смогли определить условия, при которых энуклеация без флуоресцентного окрашивания будет проходить эффективно, но при этом не будет происходить повреждение образца.

Работа была поддержана фондом РФ (грант № 21-75-10155).

**ПРИМЕНЕНИЕ ЭВОЛЮЦИОННЫХ АЛГОРИТМОВ ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ
ОПТИЧЕСКОГО ОТКЛИКА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ И
ПИГМЕНТ-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ**

**Application of evolutionary algorithms for modelling the optical response of
photosynthetic pigments and pigment-protein complexes**

Роман Ю. Пищальников

Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской Академии Наук

e-mail: rpishchal@kapella.gpi.ru, тел. +7 916 5187076

Исследование первичных процессов фотосинтеза непосредственным образом связано с численным моделированием оптических свойств пигмент-белковых комплексов (ПБК), входящих в состав клеточных мембран фотосинтезирующих организмов. Перенос энергии, как в рамках отдельного ПБК, так и между комплексами определяется не только индивидуальными характеристиками пигментов и ближайшим белковым окружением, но и их взаимном расположении в комплексе. Использование полуклассических квантовых теорий для расчёта оптического отклика ПБК позволяет связать воедино особенности возбужденных электронных состояний фотосинтетические пигментов, структуру комплексов, а также специфику экспериментальных методов измерения линейного и нелинейного оптического отклика. Однако, как показывает практика, корректное использование математического аппарата полуклассических теорий при моделировании первичных процессов фотосинтеза приводит к задачам с большим количеством свободных параметров. Часть этих параметров не может быть измерена экспериментально и является эффективными характеристиками физических явлений, учитываемых в процессе моделирования. Таким образом, при подгонке экспериментальных данных всегда встаёт вопрос о статистической значимости и единственности найденных системных параметров, обеспечивающих приемлемое совпадение экспериментальных и расчётных спектров или кинетик. Одним из возможных путей решения данной проблемы является использование оптимизационных алгоритмов для оценки качества подгонки экспериментов. Наличие современных высокопроизводительных ресурсов позволяет применять эвристические эволюционные алгоритмы, которые сейчас активно используются в прикладных задачах математического моделирования физических сред. Дифференциальная эволюции (ДЭ) – многопараметрический эволюционный алгоритм оптимизации, для

нахождения глобального минимума мультимодальных, недифференцируемых функций. Нами была разработана и успешно опробована методология моделирования линейного и нелинейного оптического отклика как для мономерных пигментов в растворителях [1,2], так и для ПБК [3].

Исследование выполнено за счёт гранта РФФИ № 22-21-00905, <https://rscf.ru/project/22-21-00905/>

1. Chesalin, D.D.; Kulikov, E.A.; Yaroshevich, I.A.; Maksimov, E.G.; Selishcheva, A.A.; Pishchalnikov, R.Y. Differential evolution reveals the effect of polar and nonpolar solvents on carotenoids: A case study of astaxanthin optical response modeling. *Swarm and Evolutionary Computation*, 75, 101210, (2022), doi:10.1016/j.swevo.2022.101210.
2. Pishchalnikov, R.Y.; Yaroshevich, I.A.; Zlenko, D.V.; Tsoraev, G.V.; Osipov, E.M.; Lazarenko, V.A.; Parshina, E.Y.; Chesalin, D.D.; Sluchanko, N.N.; Maksimov, E.G. The role of the local environment on the structural heterogeneity of carotenoid β -ionone rings. *Photosynthesis Research* 2022, doi:10.1007/s11120-022-00955-2
3. Chesalin D.D., Razjivin A.P., Dorokhov A.S., Pishchalnikov R.Y., Monte Carlo Simulation Affects Convergence of Differential Evolution: A Case of Optical Response Modeling, *Algorithms*, 16(1), 3, (2023), doi: 10.3390/a16010003

**ИССЛЕДОВАНИЕ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЦИАНИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ В
РАСТВОРАХ АМИНОСОДЕРЖАЩИХ ПОЛИМЕРОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В
БИОМЕТКАХ И МИКРОКАПСУЛАХ**

**Optical properties of cyanine dyes in solutions of amine-containing polymers used
in microcapsules and biolabels**

Василиса О. Свинко, Елена В. Соловьева*

Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет

**e-mail: vaslisa0@gmail.com, тел. +7 963 1269599*

Сочетания полимер и флуоресцентный краситель в последнее десятилетия часто используется для создания различных систем для диагностики и лечения различных заболеваний. Данные системы могут представлять собой как полностью полимерные микрокапсулы, так и входить в состав оболочки металлического или оксидного ядра. На данный момент существует 2 основных типа связывания красителя с полимером: электростатический и ковалентный. Первый является более простым в исполнении, однако получаемые с помощью него системы являются достаточно нестабильными. Второй – чуть более сложный, но более контролируемый и воспроизводимый. В дополнении на конечный продукт оказывает влияние природа и концентрация и полимера, и флуоресцентного агента. Эти факторы большей или меньшей степени приводят к изменению в спектрах флуоресценции, что, несомненно, важный нюанс, который также нужно учитывать при проектировании систем, содержащих полимер и краситель. Целью работы стало исследование влияния природы и концентрации аминоксодержащего полимера на фотохимические свойства производных цианина 5.5.

Для проведения были взяты четыре различных производных цианина 5.5. Со стороны полимеров выбраны пять различных аминоксодержащих полимеров: поли(аллиламин)гидрохлорид), поли-L-лизин, разветвленный полиэтиленамин, полидиаллил-диметиламмоний хлорид и бычий сывороточный альбумин. Системы, включающие в себя все сочетания данных веществ в равновесных условиях, были охарактеризованы с помощью регистрации спектров поглощения и флуоресценции. Подробно было рассмотрено взаимодействие полимерных молекул с красителями при варьируемой концентрации первого, предложены модели взаимосвязей.

Поли(аллиламин)гидрохлорид и полиэтиленимин способствуют образованию Н-агрегатов сульфированных производных цианина 5.5, что приводит к значительному тушению флуоресценции. Полифункциональная природа бычьего сывороточного альбумина приводит к реализации специфической адсорбции цианиновых красителей на его поверхности. Структура поли-L-лизина способствует неспецифической сорбции цианиновых красителей на его поверхности. Функциональная группа красителя оказывает меньшее влияние на его взаимодействие с полимером нежели заряд цианинового фрагмента. Наиболее интенсивный сигнал флуоресценции наблюдается для систем с бычьим сывороточным альбумином, полидиаллил-диметиламмоний хлоридом и поли-L-лизином в случаях специфической и неспецифической адсорбции.

Работа поддержана Санкт-Петербургским государственным университетом (проект № 94031307). Авторы благодарят ресурсные центры СПбГУ: «Оптические и лазерные методы исследования вещества», «Физические методы исследования поверхности», «Нанотехнологии», «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

**ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГИБРИДНЫХ СИСТЕМ ТЕРАНОСТИКИ НА
ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА И ПОРФИРИНОВ: ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ
ОТКЛИК И ГЕНЕРАЦИЯ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА**

**Photophysical properties of theranostics hybrids based on gold
nanoparticles and porphyrins: fluorescent response
and singlet oxygen generation**

*Алексей А. Смирнов**, *Алексей В. Поволоцкий*, *Елена В. Соловьева*

Институт химии Санкт-Петербургского государственного университета

**e-mail: st086257@student.spbu.ru, тел. +7 951 7435875*

В современной биомедицине крайне перспективным направлением является тераностика, сочетающая в себе одновременно диагностику и лечение заболеваний, например рака. Особенно полезными считаются мультифункциональные агенты, которые позволяют использовать несколько разных физико-химических методов одновременно, обеспечивая меньшие вмешательства в организм. Настоящая работа посвящена разработке новых агентов тераностики с выраженным флуоресцентным откликом, высокой теплоотдачей и фотоуправляемой генерацией синглетного кислорода, который является одним из наиболее важных параметров таких систем.

Конкретными объектами исследования работы являются водорастворимый (N-метил-4-пиридил)порфирин метил тозилат и его комплекс с наночастицами золота, покрытыми полимерной оболочкой варьируемой толщины. В качестве прямого метода регистрации синглетного кислорода в работе применялась люминесцентная спектроскопия, удобная для работы в органических растворителях, но не позволяющая зарегистрировать синглетный кислород в водных растворах. Косвенным методом обнаружения синглетного кислорода в водных средах выступала спектрофотометрия в присутствии деградирующего под его действием красителя.

Исследования флуоресцентного отклика полученных гибридных систем наночастица-оболочка-порфирин показали плазмонное усиление эмиссии порфирина металлическим ядром при толщине оболочки 1.5-2 нм. Зарегистрированные спектры люминесценции в области 1250-1290 нм показали генерацию синглетного кислорода в неводных средах. На основе данных спектрофотометрии в присутствии 1,3-дифенилизобензофурана

(DPBF) показана конкурирующая природа флуоресцентного отклика и генерации синглетного кислорода: при увеличении толщины оболочки и росте сигнала флуоресценции порфирина наблюдается снижение эффективности генерации им синглетного кислорода и наоборот. Таким образом, для дальнейших приложений требуется оптимизация состава и структуры исследуемых гибридных систем.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант №22-73-10052). Авторы благодарят ресурсные центры СПбГУ: «Оптические и лазерные методы исследования вещества», «Методы анализа состава вещества», «Магнитно-резонансные методы исследования» и криогенный отдел.

**АДСОРБЦИЯ И КИНЕТИКА ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ
ФОТОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО СОЕДИНЕНИЯ, ОСВОБОЖДАЮЩЕГО ПРОТОНЫ
НА ПОВЕРХНОСТИ ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЫ**

**Adsorption and functioning kinetics of photosensitive compound releasing protons
on the surface of lipid membrane**

*В.С. Соколов, В.Ю. Ташкин, Д.Д. Зыкова,
Ю.В. Харитонова, Т.Р. Галимзянов*

Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,
Москва, 119071 Россия

**e-mail: sokolovvs@mail.ru, тел. +7 916 1963800*

В исследованиях механизмов протонного транспорта через мембрану в качестве инструмента нередко используют соединения, которые молекулы которых выбрасывают протоны при возбуждении светом. Это происходит либо при отрыве и диссоциации связанной молекулы кислоты (Caged-H⁺), либо при изменении рК молекулы при ее возбуждении. Одно из таких соединений – 2-метокси-5-нитрофенилсульфат натрия (MNPS) ранее использовали для исследования кинетики протонного транспорта, осуществляемого Na,K,ATP-азой [1]. Это соединение класса Caged-H⁺ : при возбуждении молекулы MNPS происходит реакция ее гидролиза с освобождением сульфата и протона.

В настоящей работе с помощью измерений электростатических потенциалов $\Delta\phi$ бислоистой липидной мембраны (БЛМ) методом компенсации внутримембранного поля [2] изучены адсорбция MNPS и кинетика фотоиндуцированного выброса протонов на границе мембраны с раствором. Измерения $\Delta\phi$, вызванного адсорбцией анионов MNPS на БЛМ, позволили оценить их концентрацию на поверхности мембраны. При освещении БЛМ с адсорбированными на ней анионами MNPS наблюдались обратимые изменения $\Delta\phi$ и емкости мембраны. В изменение $\Delta\phi$ при освещении вносят вклад как исчезновение на мембране анионов MNPS, так и связывание на ней протонов. Для определения вклада протонов разработана теоретическая модель, которая учитывает разрушение MNPS на поверхности мембраны, сопряженное с освобождением протонов, а также обмен молекул MNPS и протонов между поверхностью мембраны и водным раствором. Вклад протонов в $\Delta\phi$ подавлялся при увеличении концентрации буфера в растворе, был пропорционален концентрации MNPS на поверхности мембраны и интенсивности освещения, возрастал при увеличении pH раствора.

Влияние рН объясняется зависимостью от него заряда БЛМ. Для БЛМ из РС наиболее сильная зависимость наблюдалась в области рН от 7 до 9. Встраивание в БЛМ фосфолипидов PE или PS, заряд которых зависит от рН, приводил к возрастанию вызванного освещением изменения $\Delta\psi$.

Увеличение концентрации протонов, выброшенных при фотолизе MNPS на границе мембраны, оказалось пропорциональным изменению их концентрации в перемешиваемом слое воды около мембраны, которое определяли с помощью независимых измерений потенциала разомкнутой цепи БЛМ с пентахлорфенолом, селективно проницаемой по протонам. Это указывает, что освобождаемые в результате фотолиза MNPS протоны на границе мембраны и в прилегающем к ней слое воды остаются в равновесии, а кинетика протонирования липидной мембраны определяется самой медленной стадией – изменением рН в перемешиваемом слое.

Работа поддержана фондом РФФ (грант № 23-24-00571)

1. В. Ю. Ташкин, А. А. Щербаков, Х.-Ю. Апель, В. С. Соколов. *Биологические мембраны* 30 (2):105-114, 2013
2. В. Ю. Ташкин, В. Е. Вишнякова, А. А. Щербаков, О. А. Финогенова, Ю. А. Ермаков, В. С. Соколов. *Биологические мембраны* 36 (2):101-108, 2019.

**МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АГЕНТЫ БИОВИЗУАЛИЗАЦИИ,
ГИПЕРТЕРМАЛЬНОЙ И ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ
АНИЗОТРОПНЫХ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА**

**Multifunctional agents for bioimaging, hyperthermal and photodynamic therapy
based on anisotropic gold nanoparticles**

*Елена В. Соловьёва**, *Василиса О. Свинко*, *Алексей А. Смирнов*,
Андрей И. Деменьшин, *Алиса И. Шевчук*, *Алексей Н. Смирнов*

Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет

**e-mails: solovyeva.elena.v@gmail.com, e.solovieva@spbu.ru*
тел. +7 950 0155056

Внедрение наноматериалов в биомедицину в настоящее время происходит все более нарастающими темпами. Потенциал золотых наночастиц как меток для биовизуализации и агентов гипертермальной и фотодинамической терапии неоднократно демонстрировался во многих современных работах [1]. Наночастицы золота анизотропной морфологии позволяют работать в первом окне прозрачности биологических тканей, что значительно повышает эффективность их использования. В настоящей работе представлены результаты исследований гибридных систем на основе анизотропных наночастиц золота и фотоактивных соединений цианинового и порфиринового ряда, которые рассматриваются как новые средства визуализации и терапии злокачественных новообразований.

В работе описаны основные этапы получения гибридных систем, включающие этапы покрытия наночастиц золота полимерной оболочкой и модификации фотоактивными соединениями, представлены данные их характеристики с помощью микроскопии высокого разрешения, динамического светорассеяния, спектроскопии поглощения и флуоресценции, комбинационного рассеяния света.

Оптимизированные по составу и структуре гибридные системы прошли клеточные испытания на цитотоксичность, степень цитопоглощения и биовизуализацию в режиме флуоресцентной и FLIM микроскопии. Полученные в виде концентрированных суспензий гибридные системы апробированы на лабораторных мышах линии ICR (CD-1) в режиме флуоресцентной и компьютерной томографии. Для исследуемых агентов получены данные о естественном биораспределении при их введении в кровоток, проведены первичные дозозависимые измерения. Результаты испытаний показали, что разрабатываемые агенты

потенциально биосовместимы, а доза 23.7 мг/мл по атомарному золоту достаточна для контрастной визуализации через кожный барьер.

Работа поддержана СПбГУ и Российским научным фондом (грант №22-73-10052). Авторы благодарят ресурсные центры Научного парка: «Оптические и лазерные методы исследования вещества», «Методы анализа состава вещества», «Нанотехнологии».

1. M. R. K. Ali, Y. Wu, M. A. El-Sayed, Gold-Nanoparticle-Assisted Plasmonic Photothermal Therapy Advances Toward Clinical Application, J. Phys. Chem. C 2019, 123, 15375–15393.

**ПРИЛОЖЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО
РАССЕЯНИЯ К ИССЛЕДОВАНИЮ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ ВНУТРИ КЛЕТОК**

**Application of surface-enhanced Raman spectroscopy to the study of folic acid
inside the cells**

Алиса И. Шевчук, Елена В. Соловьева

Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет

*e-mail: st069524@student.spbu.ru, тел. +7 951 6578527

Изучение и описание внутриклеточных процессов имеет важное значение в различных областях, таких как лекарственный мониторинг и клиническая диагностика. Для развития данных областей крайне важно снижение пределов обнаружения и повышение специфичности анализа применяемых физико-химических методов наравне с расширением круга биоактивных аналитов и их метаболитов. Метод гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) потенциально перспективен для решения этих задач, так как является высоко чувствительным и крайне селективным. Таким образом, спектроскопия ГКР может выступать в качестве дополнительного инструмента для идентификации биоактивных соединений *in vivo* и изучения их метаболизма.

Развитие новых приложений метода ГКР целесообразно проводить с использованием модельных систем. В настоящей работе в качестве модельного аналита выбрана фолиевая кислота (ФК) в виду её хорошо изученного метаболизма и решающей роли в жизненно важных процессах, включая пролиферацию как здоровых, так и раковых клеток. Поэтому ФК можно использовать в качестве основы для разработки оптических меток, применяемых в целях биовизуализации опухолевых тканей.

На первом этапе работы получены оптические метки на основе наночастиц золота, покрытых биосовместимой оболочкой, на внешнюю поверхность которой нанесена ФК. Полученные метки были инкубированы с эукариотическими клетками линии HeLa, после чего было проведено картирование клеточных образцов методом ГКР. Спектры ГКР показали смешанный набор полос, включающий сигналы от фолиевой кислоты и клеточных компонентов. Также выявлены полосы, требующие дальнейшего отнесения, вероятно, к метаболитам фолиевой кислоты. На основе обработки и анализа спектральных данных получены два типа карт: от клеточных компонентов, которые распределены по всей цитоплазме, и от исследуемых меток, которые локализованы в небольших агрегатах.

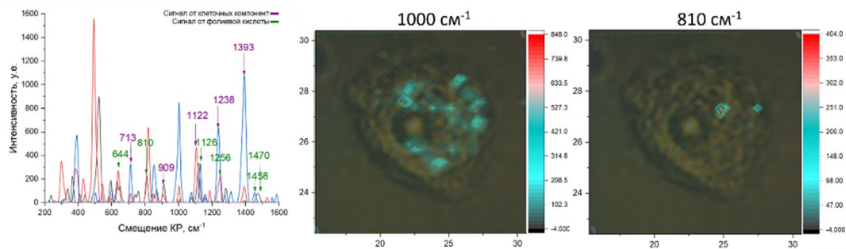


Рисунок 1. ГКР спектры оптических меток, инкубированных с клетками HeLa (получены с трех разных точек). Справа приведены карты, построенные по модам 1000 и 810 cm^{-1} .

Полученные данные демонстрируют, что ГКР спектроскопия позволяет выявить область локализации оптических меток на основе наночастиц золота после их эндоцитоза. Однако наблюдаемая агрегация модифицированных частиц внутри клетки затрудняет анализ всего её объема. Таким образом, результаты работы являются важным шагом в разработке новых спектральных методов визуализации и мониторинга опухолевых тканей и биоактивных соединений в живых организмах.

Работа была поддержана Российским научным фондом (грант № 22-73-10052). Авторы благодарят ресурсные центры: «Вычислительный», «Нанотехнологии», «ОЛМИВ».

**РАЗРАБОТКА ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОГО ПОДХОДА К ОЦЕНКЕ
ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММУНОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ НА ОСНОВЕ
ТЕХНОЛОГИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО
ВРЕМЯРАЗРЕШЁННОГО ИМИДЖИНГА**

Development of a personalized approach to evaluating the effectiveness of tumor immunotherapy based on metabolic FLIM imaging technology

Диана Южакова^{1}, Анна Изосимова^{1,2}, Дарья Сачкова^{1,2},
Константин Яшин¹, Артем Можеров¹,
Владислав Щеславский¹, Марина Ширманова¹*

¹Приволжский исследовательский медицинский университет,
Нижний Новгород

²Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

**e-mail: yuzhakova-diana@mail.ru, тел. +7 920 0493566*

Основной проблемой в области иммунотерапии опухолей является отсутствие надежных биомаркеров, позволяющих заранее определять восприимчивость индивидуальных пациентов к лечению. Биомаркеры на основе автофлуоресценции метаболитических коферментов, анализируемые в иммунных клетках, могут стать новым мощным предиктором раннего ответа опухоли на лечение, а оптический метод FLIM – инструментом прогнозирования эффективности иммунотерапии, позволяющим сохранить пространственную структуру образца и получать результаты в режиме реального времени. Применение FLIM-имиджинга для исследования функционального состояния иммунных клеток является совсем недавней тенденцией [1-2]. Пока имеется лишь несколько работ по метаболитической визуализации иммунных клеток. Валидация же метода FLIM для решения задачи оценки эффективности иммунотерапии выполнена впервые.

На первом этапе мы апробировали данную технологию на модели мышины меланомы B16F0, одной из наиболее распространенных мишеней для иммунотерапии чекпойнт ингибиторами. Установлено что, из всех параметров затухания автофлуоресценции метаболитического кофермента НАД(Ф)Н наиболее надежным маркером иммунного ответа является изменение относительного вклада свободной фракции НАДН a1, коррелирующее с ответом на анти-CTLA-4 терапию по данным роста опухолей, экспрессии маркеров активации и продукции цитокина IFN γ . Известно, что увеличение фракции свободного НАДН ассоциировано со

сдвигом в сторону гликолиза для обеспечения повышенных потребностей активированных Т-клеток. Оценка a1 НАДН в иммунных клетках свежeweделенных лимфоузлов мышей позволяет: 1) в целом выявлять ответ иммунной системы на развитие опухоли в организме; 2) различать ранний и поздний этапы туморогенеза; 3) отражать изменения при анти-CTLA-4 иммунотерапии по сравнению с контролем без лечения; 4) различать степень ответа иммунной системы на лечение, давая возможность надежно выделять группы респондеров и нереспондеров.

Помимо параметра НАДН a1, нарастающий иммунный ответ против опухоли отражает появляющийся вклад связанной формы НАДФН a3, коррелирующий с усилением пролиферативной активности лимфоцитов.

На втором этапе мы валидировали данную технологию для решения задачи прогнозирования эффективности чекпоинт иммунотерапии пациентов с глиобластомой, новой потенциальной мишенью для иммунотерапии. Была разработана *in vitro* пациент-специфическая модель на основе первичного опухолевого материала и лимфоцитов из крови пациентов. Продемонстрировано, что увеличенный вклад a1 НАДН отражает повышенную чувствительность клеток индивидуальных пациентов к анти-CTLA-4 или анти-PD-1 иммунотерапии, проявляющуюся в активации и пролиферации лимфоцитов и гибели опухолевых клеток.

Работа была поддержана грантом РФФ № 23-74-10109 (мышинная меланома) и Грантом Президента № МК-2092.2022.3 (глиобластома).

1. Walsh A.J. et al., Nat Biomed Eng., 2021;
2. Miskolci V. et al., eLife, 2022

Секция 6. БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ И ФОТОНИКА ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ

ИЗУЧЕНИЕ КОНФОРМАЦИОННОЙ ПОДВИЖНОСТИ ХРОМОФОРОВ АЛЛОФИКОЦИАНИНА ПУТЕМ ИЗМЕРЕНИЯ АНТИСТОКСОВОЙ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ

Conformational mobility of allophycocyanin by anti-stokes fluorescence

Дарья Бодунова^{1}, Даниил Гвоздев¹, Олеся Букач², Евгений Максимов¹*

¹Лаборатория физико-химии биологических мембран, биологический факультет, МГУ

²Кафедра биохимии, биологический факультет, МГУ

**e-mail: qmpzwnox065@gmail.com, тел. +7 917 2857411*

Фикобилисома, светособирающая антенна цианобактерий и красных водорослей, представляет собой водорастворимый комплекс белков фикобилипротеинов. Фикобилипротеины (РВР) включают хромофоры, фикоцианобилины, различия в спектральных характеристиках которых зависят от их структуры и белкового микроокружения. Благодаря этому хромофоры РВР расширяют спектр, доступный фотосинтезирующим организмам и реализуют эффективную передачу энергии на реакционные центры фотосистем. Исследование РВР вносит вклад в изучение механизмов преобразования энергии в процессе фотосинтеза, что необходимо для понимания принципов работы антенных комплексов и создания гибридных антенн. Кроме того, хромофоры фикобилипротеинов обладают высоким квантовым выходом флуоресценции, благодаря чему используются в биомедицине и визуализации биологических объектов.

Аллофикоцианин – один из белков РВР. Основой его структурной организации является мономер, состоящий из α - и β -субъединиц. После открытия путей их биосинтеза стало возможно получение АРС в рекомбинантных системах. Однако, при наработке препаратов β -субъединицы в *E. coli* образуются формы белка, различающиеся по степени включения хромофора и его спектральным характеристикам. В данной работе, используя комбинацию спектрофлуориметрических методов, мы показали возможность самопроизвольной сборки



аллофикоцианина из отдельных субъединиц, которая сопровождается значительными изменениями спектральных характеристик хромофоров: за счет экситонного взаимодействия хромофоров соседних субъединиц происходит батохромный сдвиг спектров поглощения и флуоресценции. Так же были определены формы белка, вступающие во взаимодействие. Анализ время-разрешенных спектров антистоксовой флуоресценции позволил выявить гетерогенность локального окружения хромофоров и проследить за её изменениями в процессе сборки АРС.

**ФОТОСТАБИЛЬНЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ФОТОПРОТЕИН БЕРОВИН С
ОПТИМУМОМ АКТИВАЦИИ ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ**

**Photostable recombinant photoprotein berovin with activation under
physiological conditions**

Людмила Буракова^{1,2*}, Никита Иванисенко^{1,3}, Евгений Высоцкий¹

¹Институт биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН,
Красноярск, 660036, Россия

²Сибирский федеральный университет, Красноярск, 660041, Россия

³Институт цитологии и генетики СО РАН, ФИЦ СО РАН,
Новосибирск, 630090, Россия

*e-mail: burakoval@mail.ru, тел: +7 923 2894558

Рекомбинантные Ca²⁺-регулируемые фотопротеины ктенофор и гидромедуз имеют низкую гомологию аминокислотных последовательностей, разные условия фолдинга *in vitro*, термостабильность и светочувствительность. Беровин из ктенофор *Beroe abyssicola* демонстрирует максимальный выход активного белка при инкубации с целентеразином в щелочных условиях (pH 9,0) и в присутствии высоких концентраций соли (0,5 М NaCl), инактивируется при облучении светом видимого диапазона длин волн и термолабилен [1]. Все это ограничивает его использование в качестве маркерной молекулы на клеточных линиях и *in vivo*. Активация же обелина из гидромедузы *Obelia longissima* происходит при физиологических условиях (pH 7,0), не зависит от соли, а фотопротеиновый комплекс термо- и фотостабилен.

В данной работе мы опробовали подход, предусматривающий замену целых фрагментов аминокислотной последовательности беровина на аналогичные обелина, как это было сделано для создания фотопротеина Photina [2]. Валидация корректности упаковки полученных последовательностей проводилась с использованием пакета AlphaFold. Замены осуществлялись в области II EF-hand, где Ca²⁺-связывающий сайт является нефункциональным. Было сконструировано три варианта генов химерных белков: с полной (BAI-OLII-BAIII-IV) и частичной (BAI-OLIIa-BAIII-IV и BAI-OLIIb-BAIII-IV) заменой II EF-hand. Оптимум pH для образования комплекса сместился в область физиологических значений, уменьшилась зависимость от соли, удельная биоломинесцентная активность для II, Па и Пб составила 37, 43 и 9 % от таковой беровина

дикого типа, соответственно, а потеря активности при облучении снизилась до 20% по сравнению с 99,99% для беровина. Остаточная активность при термоинактивации также увеличилась с 8 до 80%. Таким образом, выявлены ключевые для фолдинга и светочувствительности участки молекулы беровина. С помощью инструментов молекулярного моделирования (Rosetta) и обратного фолдинга (ProteinMPNN) предсказано, что как точечная, так и комплексная замена ряда аминокислотных остатков, расположенных в этих участках может обеспечить получение белка с заданными свойствами. Мутанты с заменами K90A и L38H/K90A/W103F/N107M показали способность к формированию фотопротеинового комплекса при физиологических условиях в сочетании со сниженной светочувствительностью фотопротеинового комплекса.

Работа была поддержана фондом РФФ (грант № 22-14-00125).

1. Markova S.V., Burakova L.P., Golz S., Malikova N.P., Frank L.A., Vysotski E.S. The light-sensitive photoprotein berovin from the bioluminescent ctenophore *Beroë abyssicola*: a novel type of Ca²⁺-regulated photoprotein. *FEBS Journal*, 2012, 279, 856–870.
2. Bovolenta S., Foti M., Lohmer S., Corazza S. Development of a Ca(2+)-activated photoprotein, Photina, and its application to high-throughput screening. *J Biomol Screen.*, 2007, 12, 694-704.

**СТРУКТУРНЫЕ ГОМОЛОГИ Ca^{2+} -РЕГУЛИРУЕМЫХ ФОТОПРОТЕИНОВ.
СПОСОБЕН ЛИ АПОФОТОПРОТЕИН ВЫПОЛНЯТЬ ФУНКЦИИ, НЕ
СВЯЗАННЫЕ С ИЗЛУЧЕНИЕМ СВЕТА?**

**Structural homologues of Ca^{2+} -regulated photoproteins: Can apophotoprotein
perform other functions than light emission?**

*Павел Наташин¹, Никита Иванисенко^{1,2}, Людмила Буракова¹,
Владимир Иванисенко^{1,2}, Евгений Высоцкий^{1*}*

¹Институт биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН,
Красноярск, 660036, Россия

²ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН»,
Новосибирск, 630090, Россия

**e-mail: eugene_yusotski@ibp.ru, тел. +7 391 2494430*

Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины – биоллюминесцентные белки, отвечающие за свечение морских гидромедуз и ктенофор. Они представляют собой комплекс, состоящий из апобелка и прочно связанного активированного кислородом целентеразина, 2-гидропероксицелентеразина, образующегося при формировании активного фотопротеина из апобелка и целентеразина в присутствии O_2 . Излучение света возникает в результате декарбоксилирования 2-гидропероксицелентеразина, инициируемого связыванием Ca^{2+} с белком. Все Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины содержат три канонических «EF-hand» Ca^{2+} -связывающих сайта. Это позволяет отнести эти белки к многочисленному семейству Ca^{2+} -связывающих белков «EF-hand» типа, регулирующих разнообразные процессы в клетках. При этом аминокислотные последовательности фотопротеинов не выявляют какой-либо значимой гомологии с таковыми белков из этого семейства [1]. К настоящему времени определены структуры четырех конформационных состояний фотопротеинов (фотопротеин с 2-гидропероксицелентеразином; Ca^{2+} -разряженный фотопротеин, связанный с продуктом реакции, целентерамидом, с Ca^{2+} и без Ca^{2+} ; и апофотопротеин, связанный с Ca^{2+}) из пяти, выявленных с помощью ЯМР. Оказалось, что фотопротеины в этих конформационных состояниях имеют похожие глобулярные структуры с небольшими отличиями, обусловленными типом связанного лиганда. Кристаллы апофотопротеина получить пока не удалось, что может быть связано с отсутствием упорядоченной 3D-структуры [1,2], т.е. апофотопротеин выявляет свойства, характерные для внутренне-неупорядоченных белков. В

настоящее время выявлено много неупорядоченных Ca^{2+} -связывающих белков, приобретающих функционально активную структуру при связывании Ca^{2+} [3].

В природе гидромедузы получают целентеразин, необходимый для образования активного фотопротейна, с пищей [4]. Но и в его отсутствие гидромедузы синтезируют апофотопротейн. Это позволяет сделать предположение, что помимо биолюминесценции апофотопротейн может выполнять в организмах-хозяевах еще какую-то функцию (или функции). Для проверки гипотезы был проведен поиск структурных гомологов Ca^{2+} -регулируемых фотопротейнов в «Protein Data Base», а также среди структур, предсказанных с помощью AlphaFold, с использованием апоакворина с Ca^{2+} (PDB 1SL8) в качестве референс-структуры. В данной работе представлены результаты исследований и их обсуждение.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ (грант № 22-14-00125).

1. Vysotski E.S., Lee J., *Acc. Chem. Res.*, 2004, 37, 405–415.
2. Ereemeeva E.V. et al., *FEBS Lett.*, 2012, 586, 4173–4179.
3. Grzybowska E.A., *Biomolecules*, 2018, 8, 42.
4. Haddock S.H. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98, 11148–11151.

**СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АКТИВАТОРА
БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ РЕАКЦИИ СИБИРСКИХ ЭНХИТРЕИД *HENLEA SP.***

**Activator of the bioluminescent reaction of the Siberian enchytraeids *Henlea sp.*:
spectral and luminescent characteristics**

Дмитрий Гульнов^{1*}, *Елена Немцева*^{1,2},
*Наталья Родионова*², *Валентин Петушков*²

¹Сибирский федеральный университет, 660041, Красноярск, пр.
Свободный 79

²Институт биофизики СО РАН, 660036, Красноярск,
Академгородок 50/50

*e-mail: dgulnov@sfu-kras.ru, тел. +7 391 2062072

Обнаруженные в Сибири почвенные черви рода *Henlea* (*H. petushkovi* и *H. rodionovae*) выделяют светящуюся (со спектральным максимумом около 464 нм) целомическую жидкость в ответ на раздражение. Для биолюминесцентной реакции *Henlea sp.* требуются четыре основных компонента: люцифераза (фермент с молекулярной массой около 80 кДа), люциферин (субстрат неизвестной природы с молекулярной массой около 0,5 кДа), кислород и ионы кальция [1]. Однако недавно были также обнаружены низкомолекулярные компоненты, усиливающие интенсивность биолюминесценции *Henlea* в десятки раз [2]. Ими оказались дезаофлавиновые производные, одно из которых известно как фактор архей F₀ (7,8-диметил-8-гидрокси-5-деазорибофлавин) [3]. Предположительно, активаторы играют роль вторичных эмиттеров биолюминесценции, то есть участвуют в безызлучательном переносе энергии с электронно-возбужденных молекул, образующихся в результате реакции, катализируемой люциферазой.

Целью данного исследования был анализ эффектов сред на спектрально-люминесцентные характеристики активатора биолюминесцентной реакции *Henlea sp.* – фактора F₀. Были изучены спектры поглощения и испускания флуоресценции, а также времена жизни флуоресценции фактора F₀ в протонных и апротонных растворителях разной полярности. В экспериментах использовали спектрофотометр Cary 5000 (Agilent Technologies) и флуориметр Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon), оснащенный модулем для регистрации спадов флуоресценции при импульсном возбуждении методом коррелированного по времени счета

одиночных фотонов (TCSPC). Анализировали положение максимумов спектров, энергию электронного перехода (0-0-перехода), стоксов сдвиг спектра флуоресценции, значения и вклады компонент времени жизни флуоресценции.

Было установлено, что максимум первой полосы поглощения F_0 слабо зависят от полярности среды. Спектральный максимум спектров флуоресценции располагается при 430-477 нм, а стоксов сдвиг варьирует в пределах 1100-2000 см^{-1} . Специфика растворителей проявляется в форме спектров, как поглощения, так и флуоресценции: наблюдается появление дополнительных пиков/плеч или уширение полос. Спады флуоресценции F_0 характеризуются двумя основными компонентами с характерными временами жизни ~ 4 и ~ 2 нс, спектральный вклад которых значительно изменяется в зависимости от растворителя.

Работа была выполнена при частичной финансовой поддержке средств государственного задания РАН (№ 0287-2021-0020).

1. Петушков В. Н., Родионова Н. С. Два новых типа люминесцентных систем почвенных энхитреид (*Annelida: Clitellata: Oligochaeta: Enchytraeidae*) // ДАН. – 2005. – Т. 401. – № 2. – С. 263-266.
2. Петушков В. Н., Родионова Н. С. Низкомолекулярные участники люминесцентной реакции сибирской энхитреиды *Henlea sp.* // ДАН. – 2018. – Т. 481. – № 4. – С. 451-454.
3. Petushkov V. N. et al. Deazaflavin cofactor boosts earthworms *Henlea* bioluminescence // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2023. – V. 21. – №. 2. – P. 415-427.

**КИНЕТИЧЕСКИЕ И СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОДУКТОВ
БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ РЕАКЦИИ Ca^{2+} -РЕГУЛИРУЕМЫХ
ФОТОПРОТЕИНОВ – ЦЕЛЕНТЕРАМИДА И ЦЕЛЕНТЕРАМИНА**

**Kinetic and spectral features of Ca^{2+} -regulated photoprotein bioluminescence
products – coelenteramide and coelenteramine**

Елена Еремеева^{1,2}, Дмитрий Гульнов², Елена Немцева^{1,2},
Людмила Буракова^{1,2}, Валентин Петушков¹, Евгений Высоцкий¹*

¹Институт биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН,
Красноярск, 660036, Россия

²Сибирский федеральный университет, Красноярск, 660041, Россия

*e-mail: l_ermeeva@mail.ru, тел: +7 391 2494430

Одним из самых широко распространенных в природе люциферинов является целентеразин, субстрат биолюминесцентной реакции Ca^{2+} -регулируемых фотопротеинов и ряда целентеразин-зависимых люцифераз, таких как люцифераза мягкого коралла *Renilla* и копеподы *Metridia*. Целентеразин-зависимые системы находятся в центре внимания уже несколько десятков лет и механизм их биолюминесценции достаточно хорошо изучен, однако процесс формирования эмиттеров всё ещё требует уточнения. Известно, что в результате реакции окислительного декарбоксилирования 2-гидропероксицелентеразина образуется целентерамид в возбужденном состоянии, переход которого в основное состояние сопровождается излучением кванта света [1]. Однако, было показано, что целентерамид не является единственным возможным продуктом этой реакции: кроме него в смеси также присутствует некоторое количество целентерамина [2]. Недавно были получены пространственные структуры фотопротеина обелина с синтетическим субстратом – целентеразином- ν до и после биолюминесцентной реакции [3, 4]. Структурные исследования показали, что именно целентерамин является основным продуктом биолюминесценции фотопротеинов с данным аналогом, что объясняет низкую биолюминесцентную активность таких белков, так как целентерамин является безызлучательным, «темновым» продуктом реакции [5].

В данной работе были исследованы спектральные и кинетические свойства продуктов биолюминесцентной реакции Ca^{2+} -регулируемых фотопротеинов – целентерамида и целентерамина, как в белке, так и в растворе. Показано, что соотношение целентерамида и целентерамина среди продуктов биолюминесцентной реакции меняется в

зависимости от типа фотопротеина, а также в случае замен различных аминокислотных остатков. Также на основании экспериментальных данных предложена схема биоломинесцентной реакции фотопротеинов, учитывающая излучательный и безызлучательный пути генерации продуктов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ № 22-14-00125.

1. Vysotski E.S., Lee J., *Acc. Chem. Res.*, 2004, 37 (6), 405–415.
2. Shimomura O., Inouye S., *Protein Expr. Purif.*, 1999, 16 (1), 91–95.
3. Larionova M.D., Ereemeeva E.V., Natashin P.V., Gulnov D.V., Nemtseva E.V., Liu D., Liu Z.-J., Vysotski E.S. *Protein Sci.*, 2022, 31 (2), 454–469.
4. Natashin P.V., Ereemeeva E.V., Shevtsov M.B., Kovaleva M.I., Bukhdruker S.S., Dmitrieva D.A., Gulnov D.V., Nemtseva E.V., Gordeliy V.I., Mishin A.V., Borshchevskiy V.I., Vysotski E.S. *Sci. Rep.*, 2022, 12 (1), 19613.
5. Inouye S., Nakamura M., Hosoya T. *Photochem. Photobiol.*, 2022, 98 (5), 1068–1076.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ЖИВЫХ КЛЕТОК *E. COLI* ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЙСТВИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ РАЗНЫХ КЛАССОВ И ИХ КОМПОЗИЦИЙ

Using bioluminescent test-system based on living *E. coli* cells to research the action antibacterial drugs of different classes and their composition

С.С. Каминская^{1*}, *Г.Ю. Ломакина*², *О.И. Верная*², *А.С. Шумилкин*²

¹МГТУ им. Н.Э. Баумана, факультет Фундаментальные науки, Москва, 105005, 2-я Бауманская ул., 5/1

²МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, 119992, Ленинские горы д. 1, стр. 3

*e-mail: kaminsk1902@yandex.ru, тел. +7 960 9097552

Перспективным направлением создания новых лекарственных форм является модификация существующих классов антибиотиков с использованием альтернативных противомикробных препаратов, например, на основе ионов серебра. Такие препараты потенциально могут повышать активность обычных антибиотиков: восстанавливать чувствительность бактерий к лекарственному средству, увеличивать проницаемость внешней и внутренней мембран, приводя к возрастанию притока антибиотика в клетку. В данной работе был использован препарат на основе гентамицина и наночастиц серебра, полученного с помощью низкотемпературного соосаждения.

Для изучения эффективности действия лекарственных композиций использовали биолюминесцентную тест-систему на основе живых клеток *E.coli*, продуцирующих люциферазу светлячков *L.mingrelica*. Эта система позволяет в реальном времени дифференцировать следующие параметры: внутри- и внеклеточную люциферазную активность, а также изменение содержания АТФ в клетках. Для измерения внутриклеточной люциферазы использовали субстратную смесь на основе люциферина с рН5.0, для измерения внеклеточной активности - рН7.8, при таких условиях люциферин не проникает в клетку. Содержание АТФ в лизированных ДМСО (для определения общего содержания АТФ) и цельных клетках (для определения внеклеточного АТФ) определяли с помощью АТФ-реагента. Концентрацию внутриклеточного АТФ вычисляли по разности общего и внеклеточного АТФ. Интенсивность биолюминесценции регистрировали на люминометре Zulus Corp. (США).

Достоинства метода – абсолютная специфичность фермента к АТФ и люциферину, высокий квантовый выход, линейная зависимость между интенсивностью испускаемого света и концентрацией АТФ, а также легкость регистрации сигнала.

Продемонстрированы возможности метода для изучения механизма действия антибактериальных препаратов. Совместное действие гентамицина и ионов серебра изучали в широком диапазоне концентраций агентов для определения минимальной бактерицидной концентрации (МБК), концентрацию клеток варьировали от 10 до 300 млн кл/мл. Реакционную смесь инкубировали в среде LB в течение нескольких часов при температуре 37°C и интенсивном перемешивании. В присутствии гентамицина наблюдалось плавное торможение роста клеток по сравнению с контролем, увеличение содержания внеклеточного АТФ и остановка синтеза внутриклеточной люциферазы. Скорость гибели клеток зависела от концентрации препарата. В качестве контроля использовали метод посевов на агаризованную среду LB.

Таким образом, биолюминесцентная тест-система может использоваться для скрининга новых лекарственных форм известных и новых антибактериальных препаратов.

Работа выполнена в рамках госзадания МГУ им. М.В. Ломоносова – номер ЦИТИС 121041500039-8.

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ

The impact of magnetite nanoparticles on bioluminescence

Арина Кичеева^{1}, Екатерина Сушко^{1,2}, Надежда Кудряшева^{1,3}*

¹ИБФ СО РАН, Красноярск, Россия

²ИФ СО РАН, Красноярск, Россия

³Сибирский Федеральный Институт, Красноярск, Россия

*e-mail: khyzylsyg@mail.ru, тел. +7 953 5915689

Магнетит считается одним из самых популярных типов наноматериалов, изучаемых в настоящее время благодаря своей доступности, универсальности и экологичности. Многие наночастицы магнетита характеризуются, помимо магнитных свойств, также биосовместимостью, химической стабильностью и возможностью функционализации поверхности; помимо этого, они являются биологически активными веществами. Эти свойства делают наночастицы магнетита перспективными для применения их в биомедицине, но также создают возможные риски для окружающей среды и живых организмов [1].

Наночастицы магнетита используются в биомедицине, включая магнитно-резонансную томографию, целенаправленную доставку лекарств, разделение и мечение клеток, магнитоопосредованную гипертермию [2]. Также наночастицы магнетита могут быть применимы в индуцирование ферроптоза, одного из типов программируемой окислительной некротической гибели клетки, характерной особенностью которой является железо-зависимое перекисное окисление липидов, связанное с выработкой активных форм кислорода (АФК). Ферроптоз известен для раковых клеток и играет важную роль в возможном лечении опухолей [3].

В качестве тестовой системы для определения биологической активности и мониторинга токсичности мы применяли биолюминесцентные биотесты, которые характеризуются простотой использования, высокой скоростью анализа, что позволяет одновременно анализировать большое число проб-образцов в сопоставимых условиях.

В нашем исследовании оценивается роль АФК в биоэффектах трех типов наночастиц магнетита: немодифицированных (Fe_3O_4), модифицированных гуминовыми кислотами ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-HA}$) и модифицированных 3-аминопропилтриэтоксисиланом ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-APTES}$).

Для мониторинга токсичности и анти-(про-)оксидантной активности наночастиц применяли бактериальные и ферментативные биолюминесцентные биотесты. Содержание АФК определяли с помощью хемилюминесцентного люминольного метода, оценивали корреляции содержания АФК с коэффициентами токсичности/анти-(про-)оксидантной активности. Токсическое действие модифицированных наночастиц магнетита было обнаружено при высоких концентрациях ($>10^{-2}$ г/л); оно было связано с накоплением АФК в бактериальных суспензиях. Все три типа наночастиц стимулировали продукцию АФК бактериями в широком диапазоне концентраций (10^{-15} –1 г/л). В условиях модельного окислительного стресса и высоких концентрациях наночастиц магнетита ($>10^{-4}$ г/л) бактериальный биотест выявил прооксидантную активность всех трех типов наночастиц при соответствующим снижении содержания АФК. Биолюминесцентный ферментативный биотест не показал чувствительности к наночастицам магнетита при незначительном изменении содержания АФК. Результаты показывают, что клеточно-мембранные процессы ответственны за биоэффекты и бактериальную генерацию АФК [4].

Работа поддержана Российским научным фондом в рамках гранта № 22-73-10222.

1. Arias L.S., et al. *Antibiotics* (Basel), Vol. 9, PP. 46 (2018).
2. Mai T., Hilt J. Z. *Colloids and Surfaces A* 576, PP. 9-14 (2019).
3. Dixon S.J., et al. *Cell*, Vol. 149, PP. 1060–1072 (2012).
4. Kicheeva A.G., et al. *Int. J. Mol. Sci.*, Vol. 24, PP. 1133 (2023).

**ОТ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ БИОТЕСТОВ ДО БИОСЕНСОРОВ: МЕТОДЫ,
РЕАГЕНТЫ И ПРИБОРЫ**

From enzymatic bioassays to biosensors: methods, reagents and devices

Валентина Кратасюк^{1,2}, Елена Есимбекова^{2,1}*

¹Сибирский федеральный университет,
660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

²Институт биофизики СО РАН, 660036, Красноярск, Академгородок

**e-mail: valkrat@mail.ru, тел. +7 967 6085643*

Для решения актуальных проблем экологического и других видов мониторинга разрабатываются ферментативные биотесты, основанные на использовании полиферментных систем, сопряженных с бактериальной люциферазой. В противовес методам химического анализа, которые занимаются поиском в окружающей среде известных загрязнителей и токсичных веществ и сравнивают их концентрацию с ПДК, ферментативные биотесты дают интегральную оценку качества или загрязнения анализируемой среды и, также как классические биотесты, показывают влияние вредных веществ на функции живых организмов (рыбы, водоросли, растения, дафнии, бактерии и т.д.). Методология комплексного ферментативного биотеста предусматривает замену живых организмов на набор репрезентативных ферментативных систем, каждая из которых обеспечивает, а значит моделирует какую-либо ключевую функцию организма – свечение, дыхание и т.д. Принципы выбора ферментных систем зависят от задач исследования. Как пример, определены составы такого теста для исследования загрязнения городских и сельскохозяйственных почв, на основе специфического действия токсикантов на ферменты. Для увеличения сроков использования ферментов и их комплексов была разработана методология получения иммобилизованных реагентов «Энзимолум», содержащих в своем составе ферменты и их субстраты для проведения одного измерения, по сути являющихся биологическим модулем биосенсора. Предлагаемые подходы обеспечивают ферментативным биотестам ценовые преимущества, универсальность, высокую чувствительность и точность, быстрый отклик, а реагенты обладают стабильностью и увеличенным сроком хранения. Подобные комплексные биотесты используются не только для оценки качества почвы, но и для мониторинга природных и промышленных

водных экосистем, загрязнения воздуха, а также для анализа качества пищевых продуктов, разнообразных материалов, включая наноматериалы.

Таким образом, на основе ферментативных биотестов разрабатываются основные элементы биосенсоров. Во-первых, в качестве объекта, на основе которого создается биологический модуль выбраны ферменты светящихся бактерий, при этом изучаются механизмы влияния разнообразных химических соединений на кинетику ферментативных систем, выясняются условия, обеспечивающие максимальную чувствительность ферментов к ксенобиотикам. Во-вторых, при изготовлении биологического модуля используется иммобилизация, позволяющая получить «сухой реагент», что также характерно для биосенсоров. Регистрацию сигнала – чаще всего это интенсивность свечения – производят на приборах – биолюминометрах. Кроме этого, отрабатывается способы создания биочипов на основе микрофлюидных устройств. Наконец, четвертая характеристика биосенсоров связана с обработкой результатов анализа. Для ферментативных биотестов это реализуется в виде компьютерных программ, представляющих собой базы данных, включающие как характеристики эталонных образцов, так и накопленные результаты анализов, и позволяющих сравнивать и охарактеризовать полученные результаты.

Работа была поддержана Российским научным фондом (грант № 23-25-10039).

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МОНИТОРИНГ НИЗКОДОЗОВЫХ РАДИАЦИОННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

Н.С. Кудряшева^{1,2}, Т.В. Рожко³*

¹Институт биофизики СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ
СО РАН, Красноярск, Россия

²Сибирский Федеральный Университет, Красноярск, Россия

³Красноярский Государственный Медицинский Университет Минздрава
России, Красноярск, Россия

**e-mail: kudr@ibp.ru, тел: +7 913 5613315*

Морские люминесцентные бактерии – чрезвычайно удобный объект для биотестирования радиационных эффектов. В качестве тестируемого физиологического параметра используется интенсивность бактериальной люминесценции. С одной стороны, результаты такого мониторинга используются для прогноза влияния радиации на морские одноклеточные микроорганизмы, с другой – можно с определенным приближением использовать полученные закономерности для прогнозирования влияния радиоактивного воздействия на высшие многоклеточные организмы, включая человека. Преимущества этого биотеста – широкая применимость, изученность, удобство регистрации физиологической функции и высокая скорость анализа. Совокупность этих преимуществ позволяет проводить большое количество анализов в сопоставимых условиях, что чрезвычайно важно для биологических исследований, и в особенности низкодозовых эффектов, которые, как правило, являются шумными и характеризуются стохастичностью.

Низкодозовые эффекты являются наименее изученными среди радиационных воздействий. В качестве условной границы низкодозовых эффектов принята доза 0,1 Грей. В Институте биофизики СО РАН такие воздействия исследуются уже более 15 лет; в качестве биотестов используются люминесцентные бактерии и их ферментативные реакции. Описаны эффекты низкодозовой радиации альфа (америций-241, торий-232, уран-235+238), бета (третий) и гамма типа. Определены зависимости интенсивности биолюминесценции от типа радиационного воздействия, а также от времени и интенсивности этого воздействия. На примере альфа и бета излучающих изотопов америция-241 урана -235+238, тория-232, трития показано, что отклик бактерий включает три последовательные

стадии: (1) пороговый эффект, (2) активацию и (3) ингибирование физиологических функций (токсическая стадия). На примере Cs-137 показано, что отклик бактерий на низкодозовую радиацию гамма типа соответствует пороговой модели и не включает активации биолюминесценции. Продемонстрировано, что отклик бактерий на низкодозовую радиацию гамма и бета типа не зависит от интенсивности радиации (соответственно от мощности дозы или концентрации радионуклида), но зависит от времени воздействия. Последний результат чрезвычайно важен для практических применений в экологических, биологических и медицинских исследованиях.

Продемонстрирована связь интенсивности биолюминесценции бактерий с изменением содержания активных форм кислорода в растворах радионуклидов. С использованием полимерных пленок, меченных тритием, показано, что этот радионуклид способен активировать бактериальную биолюминесценцию без проникновения в клетки. Методом секвенирования исследована последовательность 16S рибосомального гена РНК бактерий (ответственного за физиологические функции бактерий), подвергнутых воздействию низкодозовой альфа-, бета-, и гамма-радиации; сделан вывод что изменения интенсивности свечения бактерий в этих условиях не связаны с мутациями в исследуемой последовательности.

РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН ЛЮЦИФЕРАЗЫ *RENILLA* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Rational design of *Renilla* luciferase using molecular modelling approach

Марина Ларионова^{1*}, *Никита Иванисенко*^{1,2}, *Владимир Иванисенко*^{1,2},
*Людмила Буракова*¹, *Павел Наташин*¹,
*Елена Еремеева*¹, *Евгений Высоцкий*¹

¹Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», Институт биофизики СО РАН, Академгородок, д. 50, стр. 50, Красноярск, 660036, Россия

²Институт цитологии и генетики СО РАН, пр-т акад. Лаврентьева, д. 10, Новосибирск, 630090, Россия

**e-mail: larionova.marina@inbox.ru, тел. +7 391 2905490*

Люцифераза *Renilla* представляет собой односубъединичный белок, ответственный за биолюминесценцию мягкого коралла *Renilla*. Люцифераза дикого типа катализирует окислительное декарбоксилирование целентеразина, сопровождающееся излучением света (λ_{\max} 480 нм) [1]. Ранее был получен «желтый» мутант люциферазы из *Renilla muelleri* (RmY), излучающий с максимумом 535 нм с нативным целентеразином (CTZ) и 574 нм с аналогом CTZ-v [2]. Поскольку биолюминесценция люциферазы RmY является кофактор-независимой, а биосинтез активного фермента не требует образования S-S связей, гликозилирования и прочих посттрансляционных модификаций, «желтый» мутант зарекомендовал себя как удобный внутриклеточный сенсор для биолюминесцентного имиджинга.

Современные биоинформатические подходы позволяют не только модернизировать ферментативные функции белков, но и *de novo* предсказывать белки с заданными свойствами [3]. Поэтому рациональный дизайн с целью улучшения ферментативных свойств биолюминесцентного белка RmY является интересной научной задачей.

Для предсказания аминокислотных замен, способных изменять физико-химические свойства люциферазы *Renilla* были использованы современные методы молекулярного моделирования и глубокого машинного обучения, включая модели обратного фолдинга и белковые языковые модели. Для этого была реконструирована модель *Renilla* в комплексе с CTZ/CTZ-v, на основе которой были предсказаны мутации: (1) способные изменять полярное окружение CTZ, потенциально влияя на

спектр излучения, (2) увеличивающие термостабильность фермента, (3) влияющие на кинетику биолюминесцентной реакции.

Методом олигонуклеотид-направленного мутагенеза предсказанные замены были внесены в экспрессионный вектор pDEST566-MBP-RmY, содержащий кроме гена RmY ген мальтозо-связывающего белка (MBP), повышающего растворимость люциферазы [2]. Проведенный скрининг бактериальных лизатов *E. coli*, а также анализ препаратов очищенных белков позволили оценить влияние мутаций на изменения физико-химических свойств мутантов RmY. В результате рационального мутагенеза были получены мутантные варианты RmY, демонстрирующие ожидаемые эффекты.

Таким образом, методы молекулярного моделирования позволили предсказать комбинации точечных замен, проводящих к изменению свойств люциферазы Renilla для улучшения репортерных характеристик.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-00125. Участие докладчика в X Съезде Российского фотобиологического общества и конференции «Современные проблемы фотобиологии» реализовано при поддержке КГАУ «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности» (код заявки № 20230529-03717).

1. Titushin, M.S., Markova, S.V., Frank, L.A. et al. // Photochem. Photobiol. Sci. 2008, 7:189-196.
2. Stepanyuk, G.A., Unch, J., Malikova, N.P. et al. // Anal. Bioanal. Chem. 2010, 398:1809-1817.
3. Yeh, A.H.W., Norn, C., Kipnis, Y. et al. // Nature. 2023, 614:774-780.

**ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ СИСТЕМЫ
СВЕТЛЯКОВ *LUCIOLA MINGRELICA* В БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**

**Possibilities of using the bioluminescent *Luciola mingrelica* firefly system in
biomedical investigations**

*Г.Ю. Ломакина**, *Н.Н. Угарова*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет

**e-mail: lomakinagalina@yahoo.com, тел. +7 926 6174080*

Тест-системы на основе живых прокариотических и эукариотических клеток, продуцирующих термостабильную люциферазу светляков, могут быть использованы для изучения внешних стимулов. Это незаменимый инструмент для проведения быстрого скрининга лекарственных средств, изучения эффективности и механизма их действия, поиска эффективных композиций и создания лекарственных форм. Два биолюминесцентных внутриклеточных индикатора – динамический низкомолекулярный АТР, мгновенно реагирующий на внешние воздействия, и высокомолекулярная термостабильная люцифераза светляка использованы для изучения клеточного ответа, мониторинга клеточного гомеостаза и молекулярных изменений во времени. Показана высокая информативность индикаторов для изучения механизмов адаптации, выживания и гибели клеток в присутствии внешних эффекторов физико-химической природы (температура, лекарственные препараты, мембраноактивные соединения и др.) на живых клетках (прокариотах и эукариотах). Использование биолюминесцентных клеток позволяет изучать кинетику изменения содержания АТР и люциферазы внутри и вне клеток и регистрировать начальные стадии изменения проницаемости клеточной мембраны, оценивать степень повреждения клеток, влияние стрессоров на систему синтеза/гидролиза АТР, функционирование клеточных органелл и пр.

Приведены примеры количественного определения живых клеток, в том числе некультивируемых и медленно растущих, по содержанию внутриклеточного АТР; специфическому выявлению патогенов методом биолюминесцентного иммуноанализа; оценки эффективности и механизма действия антибиотиков разных классов и их композиций с матрицами неорганической природы на живые клетки.

Работа выполнена в рамках госзадания МГУ – номер ЦИТИС: 121041500039-8.

**ИНТЕГРАЛЬНЫЙ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ – ИНДИКАТОР
ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ ОРГАНИЗМА СПОРТСМЕНА**

**Integral bioluminescent indicator – an indicator of physical activity
of the athlete's body**

В.В. Мальшьева^{1}, Л.В. Степанова¹, А.М. Вышедко¹, В.А. Кратасюк^{1,2},
О.А. Коленчукова^{1,3}, Г.В. Жукова¹*

¹ФГАОУ ВО "Сибирский федеральный университет"

²ИБФ СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН

³НИИ МПС ФИЦ КНЦ СО РАН

*e-mail: vladislava.dolinskaya@yandex.ru, тел. +7 913 5218645

Введение. Поиск маркеров физической нагрузки и построение молекулярного профиля слюны для диагностики состояния организма значимо в спортивной медицине [1]. Бактериальная биолюминесцентная ферментативная система - перспективный метод интегрального анализа слюны и альтернативный способ контроля функционального состояния организма [2]. Цель исследования: выявление показателей слюны, изменяющие интегральный биолюминесцентный показатель слюны при разных видах физической нагрузки.

Материалы и методы. Исследованы студенты-спортсмены ОмГПУ (пловцы (аэробная нагрузка (n=25)) и легкоатлеты (анаэробная нагрузка (n=25)). Тестировали слюну до и после физических нагрузок. Биохимический анализ слюны и анализ ИК – Фурье – спектроскопии слюны был выполнен сотрудниками ООО «Ом-Лаб». Биолюминесцентное ферментативное тестирование слюны проведено на иммобилизованном реагенте «Энзимолом» (ИБФ СО РАН, Красноярск) с регистрацией свечения на портативном люменометром «Люмишот» (ООО «НПП» Прикладные биосистемы, Красноярск). Реакцию биотестов определяли по величине остаточного свечения - интегрального биолюминесцентного показателя слюны. Математическая обработка данных выполнена в программе R (Bell Labs., США). Различия между группами оценивали по критерию Вилкоксона, корреляционный анализ - по критерию Спирмена. Кластеризация методом k-средних выполнена в Python (Python Software Foundation License, США). Уровень статистической значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Выявлены две группы данных, различающиеся по аэробному и анаэробному виду физической нагрузки. Биолюминесцентный показатель слюны для анаэробной нагрузки достоверно ниже, чем при аэробной нагрузке ($p=0,004$). Повышение

активности каталазы ($p=0,0007$) отличало аэробную нагрузку от анаэробной. При этом независимо от вида физической нагрузки в слюне повышалось содержание общего белка ($p= 0,006$) и фосфолипидов ($p=0,005$), не изменялась содержание ионов аммония, триеновых конъюгатов, оснований Шиффа и сахароз. Выявлена взаимосвязь биoluminesцентного показателя слюны при анаэробной нагрузке с повышенным содержанием лактата ($r=0,4$), ионов калия ($r=0,4$), магния ($r=0,4$) и активностью супероксиддисмутазы ($r=0,4$), а также снижением концентраций триеновых конъюгатов ($r=-0,5$), метиловых групп липидов ($r=-0,4$) и аминокислот ($r=-0,4$). При аэробной нагрузке значимое влияние на биoluminesцентный показатель слюны оказывали повышенное содержание амидов ($r=0,5$) и снижение концентрации белка ($r=-0,4$) и триеновых конъюгатов ($r=-0,4$).

Таким образом, интегральный биoluminesцентный показатель слюны спортсменов повышен при аэробной нагрузке и понижен – для анаэробной нагрузки, на изменение которых в основном влияли продукты гликолиза и расщепления белка.

Работа поддержана ККФН «Академическая мобильность - I» (проект № 2023031909727).

Литература.

1. Бельская Л. В., Голованова О. А., Турманидзе В. Г., Шукайло Е. С. Перспективы использования результатов анализа слюны при планировании тренировочного режима спортсменов // Омский научный вестник. - 2011. - 6 (102). - С. 175-178.
2. Kratasyuk V.A., Stepanova L.V., Ranjan R., Sutormin O.S., Pande S., Zhukova G.V., Miller O.M., Maznyak N.V., Kolenchukova O.A. A noninvasive and qualitative bioluminescent assay for express diagnostics of athletes' responses to physical exertion // Luminescence. – 2020 - 36 (2). - P. 384–390.

ЦЕЛЕНТЕРАМИН КАК ОСНОВНОЙ ПРОДУКТ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ РЕАКЦИИ: СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Coelenteramine as a main bioluminescent reaction product: the structural study

Павел Наташин^{1}, Елена Еремеева¹, Михаил Шевцов²,
Маргарита Ковалева², Дарья Дмитриева², Алексей Мишин²,
Валентин Борщевский², Евгений Высоцкий¹*

¹Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», Институт биофизики СО РАН, Академгородок, д. 50, стр. 50, Красноярск, 660036, Россия

²Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Институтский пер., д. 9, Долгопрудный, 141701, Россия

**e-mail: pavelnatashin@mail.ru, тел. +7 391 2905490*

Целентеразин (CTZ) является наиболее изученным, а также широко распространенным в природе субстратом биоломинесцентной реакции. Он выступает в качестве субстрата как минимум у девяти различных типов организмов, включающих кишечнорастворимых, червей, ракообразных, моллюсков и позвоночных [1]. Несмотря на единый субстрат и, скорее всего, одинаковый механизм биоломинесцентной реакции, ферменты, катализирующие реакцию декарбоксилирования у этих животных, различны. Известные CTZ-зависимые биоломинесцентные белки значительно различаются аминокислотным составом и пространственной структурой, что определяет отличия параметров биоломинесцентной реакции – квантового выхода, спектров и кинетики.

Ca²⁺-регулируемые фотопротеины из морских кишечнорастворимых животных представляют собой комплекс, состоящий из белка и субстрата CTZ в преактивированной кислородом форме (2-гидропероксицелентеразина). Реакция декарбоксилирования субстрата запускается связыванием ионов кальция, в результате образуется продукт – целентерамид в возбужденном состоянии. Переход целентерамида в основное состояние сопровождается излучением света с λ_{max} в диапазоне 465–495 нм.

Целентеразин-зависимые биоломинесцентные белки широко используются в качестве биосенсоров для мониторинга биологических процессов *in vivo*, в том числе, в живых тканях, поэтому интерес к

репортерам, излучающим красный свет, очень высок. Экспериментально показано, что использование синтетического аналога CTZ (CTZ-v) сдвигает спектры биолюминесценции в красную область. Однако использование CTZ-v влияет не только на спектральные свойства биолюминесцентных белков, но и на их активность. В то время как для люциферазы *Renilla* биолюминесцентная активность остается без изменений, для фотопротейина обелина в комплексе с CTZ-v (обелина-v) сохраняется только 1.7% от активности обелина с нативным CTZ, что затрудняет его дальнейшее использование в качестве биолюминесцентного репортера [2].

В данной работе представлена кристаллическая структура обелина-v в состоянии после биолюминесцентной реакции, определенная с разрешением 2.1 Å (PDB ID 8A9S). Ее анализ показал наличие в активном центре белка «неожиданного» продукта реакции, целентерамина-v [3], который, как мы предположили, является продуктом «темнового» пути распада диоксиэтанола, интермедиата биолюминесцентной реакции, что может объяснять резкое снижение удельной активности обелина-v.

Работа была поддержана Российским научным фондом (грант № 22-14-00125).

1. Markova S.V., Vysotski E.S. *Biochemistry (Mosc.)*, 2015, 80(6), 714–732.
2. Larionova M.D., Wu L.J., Ereemeeva E.V. *et al. Protein Sci.*, 2022, 31(2), 454–469.
3. Natashin P.V., Ereemeeva E.V., Shevtsov M.B., *et al. Sci Rep.*, 2022, 12(1), 19613.

**РОЛЬ ДИФфуЗИОННОГО ОГРАНИЧЕНИЯ В ЭФФЕКТАХ СРЕД НА
БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНУЮ РЕАКЦИЮ БАКТЕРИЙ**

**The role of diffusion limitation in the effects of media on the bioluminescent
reaction of bacteria**

Елена Немцева^{1,2}, Альберт Лисица¹,
Лев Суковатый¹, Валентина Кратасюк^{1,2}*

¹Сибирский федеральный университет, 660041, Красноярск, пр.
Свободный 79

²Институт биофизики СО РАН, 660036, Красноярск,
Академгородок 50/50

*e-mail: enemtseva@sfu-kras.ru, тел. +7 391 2062072

Механизмы регуляции биохимических процессов во внутриклеточной среде, представляющей собой динамичную неоднородную систему сложного состава, всё ещё не поняты окончательно. Активность ферментов в клетке определяется многими факторами, среди которых немаловажную роль играет вязкость среды. Одним из методов экспериментального моделирования внутриклеточных условий является использование сред с различными соразвителями, что помогает уменьшить число сочетающихся регуляторных эффектов. Биолюминесцентная реакция, катализируемая бактериальной люциферазой, представляет собой многостадийный процесс, включающий формирование и распад как минимум четырёх интермедиатов, один из которых образуется в электронно-возбужденном состоянии. Данное исследование посвящено выяснению вопроса, насколько чувствительна активность бактериальной люциферазы к повышенной вязкости микроокружения, которая может возникнуть как ответ бактерий на неблагоприятные внешние условия.

Целью исследования было определение диффузионно-контролируемых стадий реакции, катализируемой бактериальной люциферазой *Photobacterium leiognathi*. Были проанализированы константы скоростей отдельных стадий реакции в средах с добавлением разных концентраций этиленгликоля, глицерина, глюкозы, сорбитола, сахарозы, декстрана (70 кДа) и полиэтиленгликоля (4 кДа). Методом остановленного потока измеряли нестационарную кинетику реакции, а затем проводили математическое моделирование кинетических кривых и таким образом определяли константы скорости отдельных стадий. Кроме того, было проведено вычисление молекулярной динамики бактериальной

люциферазы в окружении воды и соразтворителей для обнаружения возможного изменения структуры белка в вязких средах.

Полученные кинетические и структурные данные позволили выявить следующие механизмы влияния вязких сред на биолюминесцентную реакцию бактерий. Во-первых, повышенная вязкость приводит к замедлению диффузии компонентов реакции и снижению скорости связывания флавинового и альдегидного субстратов, но также способствует замедлению конкурирующих «темновых» стадий реакции (распад пероксифлавинового интермедиата, автоокисление восстановленного флавина) [1]. Во-вторых, в средах с низкомолекулярными соразтворителями наблюдается их преферативное связывание с поверхностью люциферазы и вытеснение молекул воды. В-третьих, в средах с глюкозой, сорбитолом и сахарозой каталитическая константа люциферазы увеличивается, в присутствии этиленгликоля – уменьшается. Также было получено, что растворы биополимеров влияют на кинетику реакции в соответствии со своей низкой вязкостью и молярной концентрацией, а дополнительных эффектов вследствие явления макромолекулярного краудинга не наблюдается.

Работа была выполнена при частичной финансовой поддержке РФФ (грант №22-22-00724).

1. Lisitsa, A. E., Sukovaty, L. A., Bartsev, S. I., Deeva, A. A., Kratasyuk, V. A., & Nemtseva, E. V. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(16), 8827.

СОЗДАНИЕ ПАЛИТРЫ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ МЕТОК НА ОСНОВЕ LOV-ДОМЕНА

Engineering of a palette of genetically encoded fluorescent tags based on LOV domain

*А.С. Николаев**, А.Н. Юденко, И.Ю. Гуцин

Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

**e-mail: nikolaev.as@phystech.edu, тел. +7 987 9999989*

LOV-домены (Light-Oxygen-Voltage) – это природные сенсоры синего света. В ответ на поглощение фотона, LOV-домен образует ковалентную связь со своим хромофором – флавином, далее запускается каскад конформационных изменений, передающий сигнал соседним доменам. Вводя мутацию, нарушающую образование этой ковалентной связи, LOV-домен можно превратить в флавин-связывающий флуоресцентный белок (FbFP). Такой флуоресцентный белок будет иметь маленький размер – 10-12 кДа, а также не будет зависеть от растворенного в среде кислорода. Это выгодно отличает FbFP от популярных кислород-зависимых GFP-подобных флуоресцентных белков, имеющих массу ~25 кДа. Так как LOV-домены широко распространены в природе, возможно выбрать для исследования представителя из термофильного организма, получив флуоресцентный белок с высокой термостабильностью. Недавно открытый CagFbFP из *Chloroflexus aggregans* в комплексе с флавиномононуклеотидом имеет температуру денатурации 82 °С. Чтобы стать широко-используемыми флуоресцентными метками, представители семейства FbFP требуют дальнейших модификаций. В частности, ранее не было найдено вариантов со значительными сдвигами спектра флуоресценции, поэтому FbFP затруднительно использовать для многоцветной микроскопии. Это связано с тем, что мутации аминокислот в FbFP не могут влиять на химический состав или конформацию хромофора.

В данном исследовании мы провели случайный мутагенез трех аминокислот в кармане связывания флавина, в результате чего была создана палитра из двадцати двух флуоресцентных меток на основе термостабильного LOV-домена CagFbFP¹. Максимумы эмиссии полученных белков приблизительно равномерно покрывают диапазон длин волн от 486 до 512 нм. Для двух белков на краях диапазона были

установлены физические причины сдвига спектра путем анализа кристаллографических структур, время-разрешенных спектров флуоресценции, низкотемпературной зависимости спектров флуоресценции и QM/MM моделирования. Используя белки из палитры, была продемонстрирована трехцветная микроскопия в культурах *E. coli* и двухцветная микроскопия в клетках человека (HEK293T). Эти результаты подчеркивают возможность изменения спектра флуоресценции флавиновых белков и прокладывают путь для дальнейшего применения FbFP в флуоресцентной микроскопии.

Исследование выполнено при поддержке Российского Научного Фонда, номер гранта 21-64-00018.

1. Nikolaev A. et al. Fine spectral tuning of a flavin-binding fluorescent protein for multicolor imaging // *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier, 2023. Vol. 299, № 3.

**БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ГИСПИДИНА В ЭКСТРАКТАХ ИЗ
ПРИРОДНОЙ И ЛАБОРАТОРНО ПОЛУЧЕННОЙ БИОМАССЫ
БАЗИДИОМИЦЕТА *Inonotus obliquus* (ЧАГА)**

**Bioluminescent analysis of hispidin in the extracts from natural and laboratory
obtained biomass of basidiomycete *Inonotus obliquus* (Chaga)**

*Екатерина Д. Посохина**, Владимир С. Бондарь

Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск

*e-mail: posokhinaed@bk.ru, тел. +7 913 5854517

Ранее мы сообщали о выделении люминесцентной системы из мицелия светящегося высшего гриба *Armillaria borealis* [1]. В модельных экспериментах было показано, что система применима для биолюминесцентного экспресс-анализа гиспидина (ГП) в водных пробах [2]. ГП является предшественником субстрата люминесцентной реакции высших грибов: в присутствии НАДФН он преобразуется НАДФН-зависимой гидроксилазой в люциферин (3-гидроксигиспидин), который окисляется люциферазой с излучением квантов света [3]. ГП продуцируется высшими грибами и является биоактивным соединением с рядом ценных фармакологических свойств [4].

Медицинский гриб *Inonotus obliquus* (Чага) синтезирует широкий спектр биоактивных веществ и используется в народной медицине [5]. Ранее он был внесен в Государственную фармакопею СССР и в настоящее время рассматривается в качестве неспецифического препарата для лечения заболеваний ЖКТ и предраковой терапии [5]. *I. obliquus* продуцирует ряд биоактивных полифенольных пигментов стирилпиринового типа, в том числе ГП [4,6].

Цель исследования состояла в биолюминесцентном анализе ГП в экстрактах из природной и получаемой в лабораторных условиях биомассы базидиомицета *I. obliquus*.

В работе использована люминесцентная система из мицелия *A. borealis* (штамм IBSO 2328 из Коллекции микроорганизмов ИБФ ФИЦ КНЦ СО РАН) [1]. Для анализа использовали водные экстракты из склероция базидиомицета *I. obliquus* и мицелия гриба (штамм IBSO 2430), полученного при культивировании в погруженных условиях. В питательной среде при выращивании гриба также оценивали наличие ГП, который является вторичным метаболитом высших грибов и может секретироваться во внешнюю среду [4]. Тестирование проводили на люменометре Glomax® 20/20 (Promega BioSystem Sunnyvale. Inc., США).

Показано, что склероций *I. obliquus* имеет поверхностный черный слой и центральную коричневую часть: в экстрактах из центральной части биолюминесцентным методом выявлено наличие ГП; экстракты из поверхностного слоя ингибировали люминесцентную систему *A. borealis*, вероятно, из-за присутствия в них соединений меланина. При биолюминесцентном анализе в экстрактах из выращенной в лабораторных условиях биомассы мицелия *I. obliquus* показано наличие ГП. Это свидетельствует, что культивирование в искусственных условиях не приводит к нарушениям биосинтеза ГП в мицелии данного гриба – в процессе выращивания базидиомицет *I. obliquus* продуцирует и выделяет ГП в питательную среду. Наличие и повышение содержания ГП в питательной среде в процессе роста гриба подтверждается биолюминесцентным анализом. Совокупность полученных данных позволяет говорить о возможности использования базидиомицета *I. obliquus* в биотехнологическом получении ГП для биомедицинских приложений.

1. Puzyr A.P. et al. (2017) *Cur. Res. Env. Appl. Mycol.*, 7(3): 227-235.
2. Puzyr A.P. et al. (2018) *Dokl. Biochem. Biophys.*, 480: 173-176.
3. Purtov K.V. et al. (2015) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54:8124e8128.
4. Palkina K.A. et al. (2021) *J. Fungi*, 7: 323.
5. Balandaykin M.E. Zmitrovich I.V. (2015) *Int. J. Med. Mushrooms*, 17(2): 95-104.
6. Lee I-K., Yun B-S. (2011) *The J. Antibiotics*, 64: 349-359.

**УНИКАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО ГРИБА
*Mycena gombakensis***

Unique Features of the Luminescent Mushroom *Mycena gombakensis*

Алексей Пузырь^{1*}, *Екатерина Посохина*¹, *Игорь Павлов*²,
*Антон Тимофеев*³, *Андрей Буров*^{1,4}, *Светлана Медведева*¹

¹Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск

²Институт леса ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск

³Лаборатория геномных исследований и биотехнологии ФИЦ КНЦ СО
РАН, Красноярск

⁴Федеральный исследовательский центр информационных и
вычислительных технологий, Новосибирск

**e-mail: apuzyr@mail.ru, тел. +7 965 8985937*

Ранее мы сообщали об обнаружении в 2013 году на острове Борнео образцов люминесцирующей древесины и получении из них чистой культуры светящегося мицелия, который был зарегистрирован в Коллекции культур Института биофизики СО РАН под номером ИБСО 2371 [1]. Попытки в течении 10 лет определения вида гриба были неудачны. Наш интерес к данному объекту связан с рядом его уникальных свойств, которые следуют из регистрации люминесценции на люменометре Glomax® 20/20 (Promega BioSystem Sunnyvale, Inc., USA) и системе видеодокументации GelDoc XR Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA).

К таким свойствам относятся: 1) способность образцов древесины в течение 10 лет в нестерильных условиях сохранять способность к люминесценции (образцы древесины в лесах Красноярского края, зараженные *Armillaria borealis*, сохраняют эту способность лишь в течение 1 – 2 суток); 2) пульсирующая люминесценция гиф гриба на древесине и мицелия, выросшего на агаризованной питательной среде (другие виды люминесцентных грибов из нашей коллекции не обладают этим свойством); 3) отсутствие пигментации жидкой питательной среды при выращивании пеллет (позволяет получить пеллеты большого размера в отличие от ряда других культур коллекции); 4) увеличение люминесценции после локального облучения УФ светом (можно предположить, что грибы имеют суточную динамику); 5) пеллеты при культивировании не выделяют в питательную среду вещества, стимулирующие люминесцентную реакцию *in vitro*; 6) максимальный

уровень люминесценции при инкубации пеллет в дистиллированной воде наблюдается на 6 – 7 сутки (для других видов люминесцентных грибов, как правило, на 1 – 2 сутки); 7) люминесценция пеллет находящихся в дистиллированной воде регистрируется до 35 – 50 суток.

Наравне с этими уникальными свойствами культура 2371 обладает общеизвестными характеристиками – растет на обычных питательных средах для культивирования высших грибов, позволяет из пеллет выделять ферментную люминесцентную систему, реагирующую в экспериментах *in vitro* на НАДФН и стимуляторы люминесцентных систем других грибов.

В настоящее время определен вид этого люминесцентного гриба. Им является *Mycena gombakensis* [2]. В России гриб был в 2022 и 2023 годах независимо идентифицирован в БИН РАН (Санкт-Петербург) и Лаборатории геномных исследований и биотехнологии ФИЦ КНЦ СО РАН (Красноярск). Таким образом, есть 4 коллекции в которых поддерживается культура *M. gombakensis* (Mycology Herbarium (KLU-M), Fungal Culture Collection (KUM) at University of Malaya, Коллекция культур базидиомицетов (БИН РАН), Коллекция культур ИБСО (ИБФ СО РАН).

В докладе будут продемонстрированы изменения, происходившие при длительном хранении образцов, и динамика вспышек, зарегистрированная системой видеодокументации.

Работа выполнена при поддержке мега-проекта «Биолюминесцентные биотехнологии» (договор №11.G34.31.0058) по Постановлению Правительства РФ №220 от 9 апреля 2010 г.

1. Пузырь А.П. др. (2016) Journal of Siberian Federal University. Biology 3 (9): 304-320.
2. Chew A.L.C. et al. (2014) Fungal Diversity, DOI 10.1007/s13225-014-0302-9

**ОБНАРУЖЕНИЕ СТИМУЛЯТОРА СВЕЧЕНИЯ *IN VIVO* ВЫСШЕГО ГРИБА
*NEONOTHOPANUS NAMBI***

**Finding the *in vivo* luminescence stimulator of the higher fungus
*Neonothopanus nambi***

*Никита Ронжин**, Екатерина Посохина,
Ольга Могильная, Владимир Бондарь

Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск

*e-mail: roniol@mail.ru, тел. +7 391 2494240

Светоизлучающий базидиомицет *Neonothopanus nambi* является хорошо известным объектом в изучении механизмов биолюминесценции высших грибов. Из мицелия данного гриба впервые получен экстракт, содержащий активную люминесцентную систему, которая обеспечивала продолжительное свечение экстракта *in vitro* [1]. В исследованиях с экстрактами из разных видов светящихся грибов (*N. nambi*, *Mycena citricolor*, *Panellus stipticus*, *Armillaria borealis*) было установлено, что прекурсором грибного люциферина является гиспидин, который трансформируется НАДФН-зависимой гидроксилазой в молекулу люциферина (3-гидроксигиспидин), окисляемую затем люциферазой с излучением кванта света [2].

Авторами представленной работы при экстракции внеклеточных ферментов с помощью обработки мицелия *N. nambi* β-глюкозидазой в полученных водных экстрактах был обнаружен компонент, многократно увеличивающий интенсивность свечения гриба *in vivo*. Цель работы заключалась в изучении некоторых свойств обнаруженного стимулятора.

В исследованиях использовали штамм светящегося высшего гриба *N. nambi* IBSO 2391 из Коллекции микроорганизмов (CCIBSO 836) ИБФ СО РАН (Красноярск). Эксперименты проводили с шарообразными пеллетами грибного мицелия, полученными при глубинном культивировании гриба в жидкой питательной среде [3]. Выращенные пеллеты мицелия промывали деионизированной водой для удаления остатков питательной среды и метаболитов, помещали в свежую порцию воды, содержащей β-глюкозидазу (0.5 МЕ/мл), и инкубировали 24 ч при 25°C при постоянном медленном перемешивании. После этого жидкую часть (водный экстракт) отделяли от биомассы фильтрацией через бумажный фильтр. Высоко- и низкомолекулярные компоненты экстракта разделяли ультрафильтрацией через мембрану 10 кДа. Подмембранный фильтрат, содержащий низкомолекулярные компоненты,

концентрировали на роторном испарителе, полученный концентрат использовали в экспериментах.

Показано, что добавки концентрата низкомолекулярных соединений к светящемуся мицелию значительно (от нескольких раз до 1.5 порядков) увеличивают уровень его световой эмиссии. Установлено: стимулятор свечения является термостабильным, низкомолекулярным соединением с величиной кажущейся молекулярной массы 0.46 кДа; в спектре поглощения водного образца стимулятора наблюдаются два основных пика в коротковолновой области при 205 и 260 нм и плечо в диапазоне 350-370 нм; стимулятор свечения обладает синей флуоресценцией с максимумом эмиссии 440-445 нм при возбуждении длинами волн 350-370 нм; стимулирующий свечение компонент не является субстратом (или его предшественником) люминесцентной системы гриба *N. nambi*. Механизм стимуляции свечения обнаруженным компонентом пока непонятен и требует дальнейшего изучения.

1. Bondar V.S. et al. (2014) *Dokl. Biochem. Biophys.*, 455:56-8.
2. Purtov K.V. et al. (2015) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54:8124e8128.
3. Mogilnaya O.A. et al. (2018) *Curr. Res. Environ. Appl. Mycol.*, 8:75-85.

**АКТИВАЦИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ *IN VIVO* БАЗИДИОМИЦЕТОВ
NEONOTHOPANUS NAMBI И *ARMILLARIA BOREALIS* КОФЕЙНОЙ КИСЛОТОЙ**
**Activation of *in vivo* bioluminescence of basidiomycetes *Neonothopanus nambi* and
Armillaria borealis by caffeic acid**

Никита Ронжин^{1*}, Екатерина Посохина¹, Виолетта Ле²,
Ольга Могильная¹, Юлия Захарова³, Андрей Сухих², Владимир Бондарь¹

¹Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск

²Кемеровский государственный университет, Кемерово

³Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово

**e-mail*: roniol@mail.ru, тел. +7 391 2494240

К настоящему моменту установлено, что прекурсором люциферина светящихся высших грибов является их вторичный метаболит гиспидин, трансформируемый НАДФН-зависимой гидроксилазой в люциферин (3-гидроксигиспидин), который затем окисляется люциферазой с излучением кванта видимого света [1]. При этом известно, что гиспидин образуется из 3,4-дигидроксикоричной (кофейной) кислоты под действием гиспидинсинтазы [2]. Несмотря на это, полная картина молекулярных механизмов, лежащих в основе биолюминесценции грибов, по-прежнему не раскрыта и требует дополнительного изучения.

Целью работы являлось изучение эффектов кофейной кислоты на биолюминесценцию высших грибов *in vivo* и *in vitro* на примере базидиомицетов *N. nambi* и *A. borealis*.

В исследованиях использованы штаммы высших грибов *N. nambi* IBSO 2391 и *A. borealis* IBSO 2328 из Коллекции микроорганизмов (ССIBSO 836) ИБФ СО РАН (Красноярск). Эксперименты проводили с шарообразными пеллетами мицелия, получаемыми при глубинном культивировании грибов в жидкой питательной среде [3]. Эффекты кофейной кислоты на свечения оценивали в экспериментах *in vivo* (на пеллетах мицелия) и *in vitro* (с использованием люминесцентных систем, выделенных из мицелия грибов [4]). Кофейную кислоту получали из корневищ дикорастущего бодяка девясилويدного (*Cirsium helenioides* (L.) Hill) путем водно-спиртового извлечения с последующим разделением и очисткой с применением ванкомицин модифицированного сефадекса LH-20, доочисткой вещества в условиях ВЭЖХ (Shimadzu LC-20 Prominence, Япония) на колонке Gemini 5 мкм C18 (Phenomenex, США) с подтверждением чистоты выделенного компонента ГХ-МС (Agilent 7000 В, США).

В исследованиях *in vitro* показано, что добавки кофейной кислоты не влияют на уровень световой эмиссии люминесцентных систем *N. nambii* и *A. borealis* в присутствии НАДФН. Это позволяет говорить, что в использованных экспериментальных условиях кофейная кислота не трансформируется в гиспидин. В то же время, в экспериментах *in vivo* установлено, что добавки кофейной кислоты к пеллетам мицелия изучаемых грибов, вызывают быстрое увеличение интенсивности световой эмиссии. Важно отметить, что добавки гиспидина и смеси гиспидина с НАДФН не влияли на интенсивность свечения пеллет. В целом, совокупность полученных данных указывает на наличие разных биохимических путей генерации квантов видимого света в высших грибах. Выяснение механизма активации грибного свечения *in vivo* кофейной кислотой является одной из приоритетных задач дальнейших исследований.

1. Purto V. K. et al. (2015) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54:8124-8128.
2. Mitiouchkina T. et al. (2020) *Nat. Biotechnol.*, 38: 944–946.
3. Mogilnaya O. A. et al. (2018) *Curr. Res. Environ. Appl. Mycol.*, 8:75-85.
4. Bondar V. S. et al. (2014) *Dokl. Biochem. Biophys.*, 455:56-8.

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ СЛЮНЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА

Bioluminescent analysis of saliva to assess the functional state of the body

Л.В. Степанова^{1}, В.А. Кратасюк^{1,2}, О.А. Коленчукова^{1,3}, Г.В. Жукова¹*

¹ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет»

²ИБФ СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН

³НИИ МПС ФИЦ КНЦ СО РАН

**e-mail: slyudmila@mail.ru, тел. +7 960 7735851*

Введение. Слюна – динамическая биологическая жидкость и способна изменять биохимический состав в ответ на нагрузку [1]. Полагаем, что биолюминесцентный анализ слюны может дать интегральный ответ о функциональном состоянии организма и способности организма справляться с нагрузкой. Цель исследования: выявление возможности использования биолюминесцентного анализа слюны для оценки функционального состояния организма.

Материалы и методы. Исследованы подростки г. Красноярска обоих полов в возрасте 16 лет (n=22). Слюну отбирали до и после уроков в двух учебных дней с разной трудоемкостью. Биолюминесцентное тестирование слюны проведено на иммобилизованном реагенте «Энзимолум», представляющий бактериальную биферментную систему NADH:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза, с регистрацией свечения на люминометре «Люмишот». Реакцию биотеста определяли по остаточному свечению (интегральный биолюминесцентный показатель). Показателем утомления служила величина разницы между остаточным свечением до и после учебной нагрузки. Физиологическое состояние оценивали методом биоимпедансометрии. Измеряли антропо- и физиометрические показатели организма и остроту зрения. Статистический анализ данных проведен в программе Statistica 10 с использованием непараметрического критерия при уровне значимости $p < 0,05$. Кластерный анализ проведен методом К-средних.

Результаты и обсуждения. Физиологические показатели подростков соответствовали норме, но имелись отклонения в массе тела, т.е. дефицит массы у юношей и ожирение у девушек. Большая часть подростков имела низкую остроту зрения. По показателям физического развития подростки разделились на 2 кластера.

В первый кластер вошли юноши, которые являлись спортсменами или подростками с субъективно лучшим функциональным состоянием. Биоломинесцентный показатель слюны был достоверно понижен после легкого дня и повышен - после тяжелого дня ($p=0,002$). Величина отрицательной и положительной разницы остаточного свечения была одинаковой. Следовательно, можно предположить, что подростки с нормальным здоровьем одинаково утомлялись в легкий и тяжелый день, т.е. перегрузок не было.

Во второй кластер вошли юноши и девушки, имеющие отклонения в массе (ожирение или дефицит) или нормальную массу, но с низкой остротой зрения или другими отклонениями в физиологических показателях. Биоломинесцентный показатель слюны был не достоверно понижен в обоих днях. Величина отрицательной разницы остаточного свечения была наибольшей в тяжелый день. Следовательно, можно предположить, что подростки с отклонениями в здоровье наиболее утомлялись в тяжелый день, т.е. организм испытывал перегрузку. Корреляционная взаимосвязь между биоломинесцентным показателем слюны и массой тела в легкий день ($r=-0,5$), с телесным жиром - в тяжелый день ($r=0,5$) может указывать на то, что в легкий день утомлялись подростки с дефицитом массы, а в тяжелый день - с ожирением.

Таким образом, интегральный биоломинесцентный показатель слюны может быть использован для оценки функционального состояния организма при учете персонализированных показателей.

Работа выполнена в рамках реализации проекта «502-851. Определение уровня физического развития студентов, относящихся к разным группам здоровья с помощью биоломинесцентных технологий» по программе развития СФУ «Приоритет 2030».

Литература.

1. Kratasyuk V.A., Stepanova L.V., Ranjan R., Sutormin O.S., Pande S., Zhukova G.V., Miller O.M., Maznyak N.V., Kolenchukova O.A. A noninvasive and qualitative bioluminescent assay for express diagnostics of athletes' responses to physical exertion // Luminescence. – 2020 - 36 (2). - P. 384–390.

**БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ СЛЮНЫ РАБОТНИКОВ
ЖЕЛЕЗНОДОРОЖНОГО ТРАНСПОРТА ДЛЯ МОНИТОРИНГА СОСТОЯНИЯ
ОРГАНИЗМА ПРИ ТРУДОВОЙ НАГРУЗКЕ**

**Bioluminescent analysis of saliva of railway transport workers for monitoring the
state of the body during work load**

Л.В. Степанова^{1}, В.А. Кратасюк^{1,2}, О.А. Коленчукова^{1,3}, Г.В. Жукова¹*

¹ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет»

²ИБФ СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН

³НИИ МПС ФИЦ КНЦ СО РАН

**e-mail: slyudmila@mail.ru, тел. +7 960 7735851*

Введение. Слюна по биохимическому составу эквивалентна плазме крови и может являться показателем состояния организма [1]. Биоломинесцентное ферментативное тестирование слюны может дать интегральную оценку состояния организма о способности организма справляться с нагрузкой. Цель исследования: выявление возможности использования биоломинесцентного анализа слюны для мониторинга состояния организма.

Материалы и методы. Исследован диспетчерский состав (n=20) Красноярской железной дороги – филиала ОАО «РЖД» в течение 5 недель (август-сентябрь 2022 г.). Отбор проб слюны проводили до и после рабочего дня.

Биоломинесцентное тестирование слюны проводили с использованием авторской платформенной технологии биоломинесцентного ферментативного биотестирования профессора Кратасюк В.А. Использован комплекс реагентов аналитической биоломинесценции (ИБФ СО РАН, Красноярск). Свечение регистрировали на планшетном люминометре (TriStar LB 941, Германия). Интегральный биоломинесцентный показатель слюны определяли по уровню тушения биоломинесцентного свечения по сравнению с контролем.

Для понимания факторов, влияющих на изменение интегрального биоломинесцентного показателя, анализировали корреляционную взаимосвязь с лактатом, который определяли спектрофотометрическим методом при колориметрировании слюны с хлоридом железа III на длине волны 440 нм.

Статистический анализ данных проведен в программе Statistica 10 с использованием непараметрического критерия при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования. Биолюминесцентный показатель слюны понижался после трудовой нагрузки в течение 5-ти недель в группе потенциально здоровых работников и неоднозначно изменялся (повышался или понижался) для работников, которые имели хронические заболевания. Следовательно, потенциально здоровых работников можно охарактеризовать как стрессоустойчивыми, которые способны справляться с перегрузками на рабочем месте. Работников с хроническими заболеваниями можно отнести в группу риска, которые испытывали трудности на рабочем месте, т.е. утомлялись.

Концентрация лактата в слюне работников обеих групп была наибольшей в утреннее время и наименьшей - после трудовой нагрузки. Биолюминесцентный показатель слюны обратно коррелировал с концентрацией лактата в слюне в утреннее время ($r = -0,8$, $p \leq 0,05$). Понижение концентрации лактата в слюне после трудовой нагрузки свойственно преимущественно женщинам, а для мужчин - повышение или понижение. Следовательно, женщины по сравнению с мужчинами способны адаптироваться к трудовой нагрузке в течение дня, что также подтверждено на исследованиях медицинских работников [2].

Таким образом, интегральный биолюминесцентный показатель слюны может быть использован для определения состояния организма во время трудовой нагрузки при учете персонифицированных показателей.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ и ККФН (проект № 23-25-10039).

Литература.

1. Kratasyuk V.A., Stepanova L.V., Ranjan R., Sutormin O.S., Pande S., Zhukova G.V., Miller O.M., Maznyak N.V., Kolenchukova O.A. A noninvasive and qualitative bioluminescent assay for express diagnostics of athletes' responses to physical exertion // Luminescence. – 2020 - 36 (2). - P. 384–390.
2. Córdova-Martínez A., Pérez-Valdecantos D., Caballero-García A., Bello H.J., Roche E., Noriega-González D. Relationship between Strength and Professional Quality of Life of Nurses Working Hospital Emergency Departments. // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2023 - 20(3) – P.2052.

ИНТЕГРАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ПАВ НА ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Sensitivity of enzymatic and cellular bioassays to different surfactants

Олег Сутормин^{1,2}, Елизавета Колосова², Ирина Торгашина²,
Надежда Кудряшева^{2,3}, Валентина Кратасюк^{2,3}, Юлия Петрова¹*

¹БУ ВО «Сургутский государственный университет»

²ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет»

³Институт биофизики СО РАН

*e-mail: sutormin_os@surgu.ru, тел. +7 933 9965554

Имеющиеся данные о результатах оценки токсического действия поверхностно-активных веществ (ПАВ) методами биотестирования показывают, что наибольшей чувствительностью и быстрым временем отклика на токсическое действие ПАВ обладают светящиеся бактерии *Vibrio fischeri* and *Photobacterium phosphoreum* [1]. Данный результат, вероятно, говорит о том, что ПАВ оказывают воздействие на молекулярный уровень светящихся бактерий. Настоящая работа направлена на изучение и сравнение эффектов анионных, катионных и неионогенных ПАВ, на примере, лаурилсульфат натрия (ЛСН), цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ) и полиоксиэтилен 20 сорбитан моноолеата (Твин 80), соответственно, на клетки биолюминесцентных бактерий *Vibrio fischeri* и выделенную из них сопряженную биферментную систему НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза и бактериальная люцифераза (Л + Р). По результатам исследований показано, что как клеточные, так и ферментативные тест-системы обладают чувствительностью к анионному ПАВ – ЛСН. Полученные значения токсикологических параметров IC_{50} и EC_{50} для ферментной сопряженной Р + Л системы и для клеток светящихся бактерий в присутствии ЛСН составили 10^{-5} М и 10^{-2} М соответственно. При этом, стоит отметить, что, с точки зрения токсикологии окружающей среды, особо интересными для исследований и анализа являются концентрации ЛСН от 0,5 до 4 мг/л, так как именно эти концентрации ЛСН обнаруживаются в природных водах [2]. Воздействия указанных концентраций ЛСН приводят к ингибированию активности ферментативной Р + Л системы с 80% до 42%, что можно отнести к токсическим эффектам. Однако, концентрации ЛСН от 0,5 до 4 мг/л не приводят к какому-либо воздействию на клетки светящихся бактерий. Катионный и неионогенный ПАВ – ЦТАБ и Твин 80, соответственно, не

оказывают существенного влияния на биолюминесцентные клеточную и сопряженную ферментативную тест-системы, при концентрациях, ниже критической концентрации мицеллообразования. Отсутствие негативных воздействий Твин 80 на используемые тест-системы можно рассматривать результат, который поддерживает мнение о безопасном использовании технологии восстановления почв, загрязненных различными токсикантами, с использованием Твин 80 [3].

1. Jardak K., Drogué P., Daghrir R. Surfactants in aquatic and terrestrial environment: Occurrence, behavior, and treatment processes // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2016. V. 23. P. 3195–3216.
2. Freitas, R., Silvestro, S., Coppola, F., Costa, S., Meucci, V., Battaglia, F., Intorrec, L., Soares A.M.V.M., Prettic, C., Faggio, C. Toxic impacts induced by sodium lauryl sulfate in *Mytilus galloprovincialis* // *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 2020. V. 24. P. 110656.
3. Cheng M., Zeng G., Huang D., Yang C., Lai C., Zhang, C., Liu Y. Advantages and challenges of Tween 80 surfactant-enhanced technologies for the remediation of soils contaminated with hydrophobic organic compounds // *Chem. Eng. J.* 2017. V. 314. P. 98–113.

ВЛИЯНИЕ ФУЛЛЕРЕНОЛОВ РАЗНОЙ СТРУКТУРЫ НА БАКТЕРИАЛЬНУЮ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ

The effect of fullerlenols of different structures on bacterial bioluminescence

Екатерина Сушко^{1}, Арина Кичеева¹, Евсей Степин²,
Анна Сачкова³, Надежда Кудряшева^{1,2}*

¹Институт биофизики СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ
СО РАН, Красноярск, Россия

²Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

³Томский политехнический университет, Томск, Россия

*e-mail: kkovel@yandex.ru, тел. +7 999 4438641

В настоящее время успехи в разработке, производстве и применении водорастворимых производных фуллеренов (аллотропная форма углерода, наноразмерные сферически-замкнутые молекулы) намного опережают исследования их свойств. Эти соединения перспективны в медицине, фармакологии и биотехнологии, поскольку обладают высокой биосовместимостью и широким спектром биологической активности (проявляют антиоксидантные, радиозащитные, антибактериальные, противовирусные, противогрибковые, противоопухолевые свойства). Известно, что производные фуллеренов могут проявлять токсический эффект, однако эти свойства изучаются в несопоставимых условиях, на разных живых объектах и остаются малоизученными. В связи с этим возникает потребность прогнозирования свойств наночастиц на основе связи между их структурными характеристиками и характеристиками их токсичности.

Проведен анализ влияния фуллеренолов различной структуры ($C_{60,70}O_y(OH)_x$, где $x+y = 10-12$; $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$, где $x+y = 20-24$; $C_{60}O_y(OH)_x$, $C_{60,70}O_y(OH)_x$, где $x+y = 24-28$; $C_{60,70}O_y(OH)_x$, $Fe_{0,5}C_{60}O_y(OH)_x$, $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$, где $x+y = 40-42$) на бактериальную биолюминесценцию в сопоставимых условиях. Для мониторинга воздействия фуллеренолов использовали люминесцентные клеточные и ферментативные биотесты (соответственно светящиеся морские бактерии *Photobacterium phosphoreum* и выделенные из них ферменты). Эффекты фуллеренолов оценивали по изменению интенсивности биолюминесценции тестовых систем. Возможность использования биолюминесцентных систем различной сложности позволяет сравнивать эффекты на клеточном и биохимическом уровнях.

В работе продемонстрирован высокий потенциал люминесцентных биотестов (клеточного и ферментативного) для сравнения эффектов фуллеренолов. В результате проделанной работы было выявлено, что структурные свойства фуллеренолов определяют их свойства. Фуллеренолы ингибируют биолюминесценцию тестовых систем при концентрациях $>10^{-3}$ г/л, так как уменьшают содержание АФК в исследуемых растворах. Меньшей ингибирующей способностью обладают фуллеренолы в структуре которых количество кислородосодержащих групп приблизительно равно $\frac{1}{2}$ количества атомов углерода в каркасе фуллеренола, что связано с соотношением размера фрагментов гидрофобной π -системы и количеством полярных кислородосодержащих групп. Фуллеренолы интенсивнее ингибируют биолюминесценцию бактериального биотеста, чем ферментативной системы, что вероятно связано с наличием дополнительных путей воздействия на гидрофобные фрагменты бактериальной клеточной мембраны. Наименьшей ингибирующей способностью для бактериальной тестовой системы обладают Gd-содержащие фуллеренолы $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x+y=20-24$; $x+y=40-42$), что, вероятно, связано с большим размером их углеродного каркаса и склонностью к агрегации. Фуллеренолы ускоряют автоокисление НАДН – эндогенного восстановителя (в ферментативном и неферментативном процессе), а также окисление НАДН эндогенным окислителем – ФМН (в ферментативном процессе), что вносит вклад соответственно в уменьшение и увеличение скорости биолюминесцентной реакции.

Участие в конференции было поддержано КГАУ «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности» (код заявки: 2023031309585).

Секция 7. ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИЕ ОРГАНИЗМЫ КАК ПРЕОБРАЗОВАТЕЛИ СОЛНЕЧНОЙ ЭНЕРГИИ В БИОТОПЛИВА И ЦЕННЫЕ ПРОДУКТЫ

СТАБИЛЬНОСТЬ ФИКОБИЛИПРОТЕИНОВ ПРИ ИХ ХРАНЕНИИ В ВОДНО-СПИРТОВОМ РАСТВОРЕ

Stability of phycobiliproteins during their storage in water-alcohol solution

*Андрей Боровков, Ирина Гудвилович**

ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН»

**e-mail: gudirina2008@yandex.ru, тел. +7 978 8557513*

Фикобилипротеины представляют собой окрашенные флуоресцирующие белково-пигментные комплексы, присутствующие у цианобактерий и некоторых групп водорослей.

С коммерческой точки зрения фикобилипротеины являются ценными природными веществами, находящими применение в нутрицевтике и фармацевтике, пищевой и косметической промышленности, а также в биомедицинских исследованиях и клинической диагностике. Наиболее известными представителями этой группы являются синий пигмент С-фикоцианин (С-ФЦ) и красный пигмент В-фикоэритрин (В-ФЭ), накапливающиеся в клетках цианобактерии *Arthrospira (Spirulina) platensis* и красной микроводоросли *Porphyridium purpureum*.

Применение ФБП ограничивается их низкой стабильностью: они разлагаются под воздействием света, температуры и некоторых других физико-химических факторов. Для защиты структуры ФБП часто используют стабилизирующие агенты, позволяющие сохранить цвет пигментов и избежать их денатурации, однако, не все из них допустимы при использовании ФБП в медицине и пищевой промышленности.

В работе рассмотрено хранение С-ФЦ и В-ФЭ в водно-спиртовых растворах с концентрацией этанола 20%. Деградацию ФБП оценивали с помощью УВ-спектрофотометрии на основе изменения оптических характеристик их водных растворов.

Концентрации всех пигментов, за исключением АФЦ, гиперболически снижались при хранении на свету при комнатной температуре. Наиболее неблагоприятным фактором, определяющим деградацию и сроки хранения исследованных ФБП, оказался световой, а

самая высокая скорость деструкции пигментов в водно-спиртовых растворах наблюдалась при хранении их на свету при комнатной температуре. Пигмент С-ФЦ оказался менее стойким по сравнению с В-ФЭ, его концентрация существенно снижалась даже при наиболее благоприятных условиях хранения (темнота, холод). Пониженная температура (3-5°C) и отсутствие света являются предпочтительными условиями хранения ФБП водно-спиртовых растворах. Допустимо также хранение В-ФЭ в темноте при комнатной температуре. Такие условия обеспечивают сохранность существенной части пигментов: С-ФЦ на срок до 30 суток, а В-ФЭ – до 90 суток.

Разработаны рекомендации по условиям хранения С-ФЦ и В-ФЭ в водно-спиртовых растворах, обеспечивающие сохранность не менее 85% пигментов на протяжении 25-30 суток. Хранение водно-спиртовых экстрактов пигментов в темноте на холоде является предпочтительным. Полученные результаты демонстрируют относительную стабильность ФБП, что позволяет вводить их в рецептуру продуктов питания и напитков, как альтернативу химическим пигментам.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (№ гос. регистрации 121030300149-0).

**АДАПТАЦИЯ ФОТОВАУТОТРОФНЫХ КУЛЬТУР МИКРОВОДОРОСЛЕЙ К
НЕДОСТАТКУ ЭЛЕМЕНТОВ ПИТАНИЯ**

Adaptation of photoautotrophic microalgae cultures to nutrient deprivation

В.И. Гречаник, А.А. Цыганков*

ИФПБ РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино

**e-mail: vi.semina@gmail.com, тел. +7 915 4624524*

Некоторые виды микроводорослей способны к светозависимому выделению водорода после темновой анаэробной адаптации. Но этот процесс краткосрочен, так как ингибируется кислородом. Для его продления культуры помещают в условия недостатка серы, азота, фосфора или углерода (стресс). Адаптация культур к недостатку элемента питания приводит к понижению активности фотосистемы 2 (ФС2), скорость дыхания становится выше скорости фотосинтеза, и культуры переходят в анаэробные условия, в которых и синтезируется гидрогеназа. После ее синтеза начинается длительное выделение водорода. В целом описано 10 механизмов, участвующих в снижении активности ФС2, однако разные авторы указывают один-два механизма.

Целью работы являлось выявление механизмов, вовлеченных в снижение активности ФС2 в условиях стрессов, приводящих к выделению водорода.

У фотоавтотрофных культур *Chlamydomonas reinhardtii*, при недостатке N в анаэробных условиях не наблюдалось ни выделения H₂, ни существенного снижения активности ФС2. Для начала выделения H₂ требовался специальный режим освещенности. Реальный квантовый выход ФС2 не снижался до 0. Разобщения водоокисляющего комплекса с реакционными центрами не наблюдалось. В случае недостатка C в разных режимах освещения не происходило накопления крахмала, в отличие от недостатка N, но поведение параметров флуоресценции и динамика содержания аскорбата были схожими. В случае недостатка S разобщение водоокисляющего комплекса и ФС2 имело место сразу после наступления анаэробноза. Это подтверждается резким увеличением содержания аскорбата. Падение активности ФС2 в фазе поглощения кислорода не связано с накоплением аскорбата или повышением V_j, dV/dt₀, а обусловлено перевосстановлением пула пластохинонов. Таким образом, любой тип голодания микроводорослей приводит к деградации ФС2,

однако механизм деградации может различаться и не быть связанным с накоплением аскорбата. Следовательно, существуют дополнительные факторы, которые модифицируют ответную реакцию водорослей на стресс.

Согласно нашим исследованиям, указанные механизмы не работают одновременно, а реализация конкретного механизма ингибирования ФС2 определяется не только элементом питания, а другими факторами внешней среды, прежде всего светом. В зависимости от интенсивности света фотоавтотрофные культуры *C. reinhardtii* при недостатке элементов питания могут реализовывать различные механизмы ингибирования активности ФС2.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-14-00255.

**ВЛИЯНИЕ АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ НА РОСТ, ПРОФИЛЬ ЖИРНЫХ КИСЛОТ
И ПИГМЕНТНЫЙ СОСТАВ МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLORELLA*
(*CHROMOCHLORIS*) *ZOFINGIENSIS* (CHLOROPHYTE) И ЕЕ
СОПУТСТВУЮЩЕГО МИКРОБИОМА**

**Effect of Abscisic Acid on Growth, Fatty Acid Profile, and Pigment Composition
of the Chlorophyte *Chlorella (Chromochloris) zofingiensis* and
Its Co-culture Microbiome**

Татьяна А. Козлова^{1*}, Александр В. Карташов², Елена Заднепровская²,
Анастасия Крапивина², Петр Зайцев^{3,4,5},
Ольга Чивкунова³, Алексей Е. Соловченко³

¹Лаборатория Экологии, Институт Природно-Технических Систем РАН,
Курортный просп. 99/18, 354024 Сочи, Россия

²Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН,
Ботаническая 35, 127276 Москва, Россия

³Биоинженерия, Биологический факультет, Московский
Государственный Университет им. Ломоносова,
ул. Ленинские Горы 1–12, 119234 Москва, Россия

⁴Институт Естествознания, Тамбовский Государственный Университет
им. Державина, Комсомольская пл. 5, 392008 Тамбов, Россия

⁵Федеральный исследовательский центр химической физики
им. Н.Н. Семенова, РАН, ул. Косыгина 4, стр1, 119192 Москва, Россия

*e-mails: k_tatiana15@yahoo.com; kartashov@ifr.moscow;
zadneprovskaya@ifr.moscow; a.krapivina35@gmail.com;
zaytsevp@my.msu.ru; olga.chivkunova@mail.ru; solovchenkoae@my.msu.ru*

Микроводоросль *Chlorella (Chromochloris) zofingiensis* привлекает все большее внимание исследователей как потенциальный конкурент *Haematococcus pluvialis* в производстве астаксантина и других ксантофиллов. Фитогормоны, включая абсцизовую кислоту (АБК), в концентрациях, соответствующих сточным водам гидропонии, зарекомендовали себя как мощные индукторы продуктивности биомассы микроводорослей и биосинтеза ценных молекул. Основной целью этого исследования была оценка влияния фитогормона АВА на физиологию *C. zofingiensis* в нестерильном стационарном эксперименте. Экзогенный АБК стимулировал деление клеток *C. zofingiensis*, выработку биомассы, а также биосинтез хлорофилла, каротиноидов и липидов. Взаимосвязь между концентрацией экзогенного АБК и масштабом наблюдаемых эффектов была нелинейной, за исключением роста клеток и выработки биомассы.

Накопление и состав жирных кислот зависели от концентрации АБК. Экзогенный АБК вызвал значительные изменения в основных компонентах культурального микробиома *C. zofingiensis*. Так, численность представителей рода *Rhodococcus* резко возростала с увеличением концентрации АВА, в то время как численность представителей родов *Reyranella* и *Bradyrhizobium* снижалась. В работе обсуждаются возможности применения экзогенной АБК для повышения продуктивности биомассы, каротиноидов и жирных кислот в клетках *C. zofingiensis*. Статистический и метагеномный анализы включали односторонний дисперсионный тест (ANOVA), критерий суммы рангов тест Манн–Уитни, РСС (коэффициент корреляции Пирсона), демультимплексирование и обрезка адаптеров (Illumina v. 2.6, USA), анализ филотипов (ASV, Amplicon sequence variant; phyloseq, DECIPHER и SSU 16s rRNA SILVA база данных). Также, индексы α - и β -разнообразия по Шеннону, Симпсону и Моришита были рассчитаны и визуализированы с Python (версия 3.7.1) и Matplotlib.

Работа была поддержана фондом РФ (гранты № 19-14-00118, № 20-74-10028), Министерством Науки и Высшего Образования РФ (проект № 122042700044-6).

ДВУХКОМПОНЕНТНАЯ МОДЕЛЬ ДИНАМИКИ БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА БИОМАССЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Two-component model of biochemical composition dynamics of microalgae biomass

Александр Лелеков

ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей
имени А.О. Ковалевского РАН»

e-mail: a.lelekov@yandex.ru, тел. +7 978 7891071

В процессе роста культуры микроводорослей происходят значительные изменения биохимического состава биомассы. В литературе приводятся многочисленные экспериментальные данные о накоплении белка, липидов, углеводов, пигментов, известны факторы среды, позволяющие управлять их содержанием. Однако на сегодняшний день практически отсутствуют модельные представления, позволяющие объяснить и количественно описать полученные экспериментальные результаты. Относительное содержание того или иного компонента в биомассе микроводорослей изменяется в разы даже при полном минеральном обеспечении, что говорит об определяющем влиянии световых условий не только на скорость роста культуры, но и на биохимический состав клеток. Ранее [1] предложена двухкомпонентная модель роста культуры микроводорослей, которая позволяет объяснить механизмы влияния света макромолекулярный состав биомассы. Основной задачей настоящей работы являлось верификация предложенной модели с целью определения ключевых видоспецифических параметров культуры.

В основе предлагаемой модели лежит предположение о двухстадийности фотоавтотрофного роста. Первой стадией является собственно фотосинтез, в результате которого за счёт световой энергии образуются простейшие углеводы. Эти углеводы не являются структурными компонентами клеток, а представляют собой энергетический и углеродный резерв для всех последующих метаболических реакций. На второй стадии происходит биосинтез клеточных структур за счёт энергии, выделяющейся при окислении фотосинтетических углеводов. Важным аспектом, который позволяет значительно упростить математические преобразования, является предположение о пропорциональности всех структурных компонентов биомассы, которое подтверждается экспериментально линейной

корреляцией хлорофилла *a* и белка для микроводорослей различных систематических групп. Анализ модели показал, что возможны два варианта лимитирования роста микроводорослей: внешнее (световое), обусловленное недостаточным притоком энергии ФАР, и внутреннее (метаболическое), связанное с преобразованием ресурсных форм биомассы в структурные. Кроме того, при низких значениях биомассы необходимо выделить область нелимитированного роста. Таким образом, на накопительной кривой роста, даже при отсутствии лимита по биогенным элементам, будет наблюдаться не менее двух точек, в которых происходит переключение лимитирующего фактора или звена, если рассматривать внутриклеточные потоки субстрата. Для каждого участка накопительной кривой получены аналитические решения предлагаемой модели, которые выражены в элементарных функциях и позволяют описать изменение биохимического состава. Проведена верификация модели на экспериментальных данных роста биомассы и динамики относительного содержания хлорофилла *a* культуры красной морской микроводоросли *Porphyridium purpureum* при различной освещённости. Рассчитаны видоспецифические параметры порфиридиума: максимальная удельная скорость фотосинтеза и синтеза структурной биомассы, удельная скорость эндогенного расхода биомассы, а также доля хлорофилла *a* в структурной биомассе.

Работа выполнена в рамках темы госзадания ФИЦ ИнБЮМ № 121030300149-0.

1. Лелеков А.С., Тренкеншу Р.П. Двухкомпонентная модель роста микроводорослей в плотностате // Математическая биология и биоинформатика. – 2021. – Т.16, № 1. – Р.101–114. – doi: 10.17537/2021.16.101.

ТЕПЛОВОЙ ШОК И ФОТОСИСТЕМЫ 1 И 2: НЕ ВСЁ ТАК ОДНОЗНАЧНО

Heat shock and photosystems 1 and 2: Not so unambiguously

Е.А. Лысенко^{1}, М.А. Козулева^{1,2}, А.А. Клаус¹,
Н.Л. Пишбытко³, В.В. Кузнецов¹*

¹Институт физиологии растений РАН, Ботаническая 35,
127276, Москва, Россия

²Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Институтская 2,
142290, Пушкино, Московская обл., Россия

³Белорусский государственный университет, Биологический факультет,
пр. Независимости 4, 220030, Минск, Беларусь

**e-mail: genlysenko@mail.ru; +7 499 2318344*

Глобальное потепление делает снова актуальным старые добрые исследования теплового шока (ТШ). Мы поставили сложный эксперимент, необычный по многим параметрам.

Во-первых, оказалось, что молодые злаки способны выдерживать непрерывный ТШ в течение 2 суток. Все растения выживали при 42°C, и почти все выживали даже при 46°C. Вероятно, постоянное слабое освещение (60-80 мкмоль фотонов/м² с) способствовало выживанию.

Во-вторых, пониженная влажность воздуха снижала фотохимическую активность ФС1 и ФС2, а также общее состояние растений при 42°C и особенно 46°C.

Темновая преадаптация и измерение фотохимической активности (метод РАМ) проводились при той же температуре, к которой растения адаптировались предыдущие 48 ч (24/37/42/46 °C). Это позволило выявить активацию относительной активности фотосистем при 37°C (больше) и 42°C (меньше). Активность ФС2 изменялась сильнее, чем ФС1; это было верно как при активации, так и при ингибировании. Эти результаты представлены в статье [1]. Их можно дополнить наблюдавшейся ранее активацией транскрипции генов реакционных центров ФС1 и ФС2 в хлоропластах при 40°C [2].

В-четвертых, С₃-растение ячмень и С₄-растение кукуруза показали разный вклад нефотохимических процессов. При ТШ их фотохимическая активность менялась сходным образом, но за счет различного вклада нефотохимического тушения и лимитирования ФС2 на акцепторной стороне. Публикация по этим материалам подготовлена. Сравнение фото-

и нефотхимических процессов ФС2 оказалось возможным при помощи новых коэффициентов qC и $X(II)$, опубликованных в предыдущей работе [3].

Работа основана на последовательном применении методов IC и RLC, что так же было обосновано в предыдущей работе [4].

В-пятых, различные стрессы ускоряют ранние процессы реадaptации фотосинтетического аппарата к свету. Но рассказать об этом, скорее всего, уже не хватит времени.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема №122042700044-6) и при частичной поддержке гранта РФ № 14-14-00584.

1. Lysenko E.A. et al. // Plant Physiol. Biochem. 2023, v.194, p.246-262.
2. Zubo et al. // Russ. J. Plant Physiol. 2008, v.55, p.293-300.
3. Lysenko E.A. et al. // Plant Physiol. Biochem. 2020, v.147, p.191-204.
4. Lysenko E.A. // Photosynthetica 2021, v.59, p.245-255.

**ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА – УНИВЕРСАЛЬНЫЙ ИНСТРУМЕНТ
МОНИТОРИНГА КУЛЬТУР МИКРОВОДОРОСЛЕЙ**

А.Е. Соловченко

Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова

e-mail: solovchenkoa@my.msu.ru

Переменная флуоресценция хлорофилла (ФХ) фотосинтетического аппарата является богатым источником ценной информации о физиологическом состоянии фотосинтезирующих организмов, включая микроводоросли. В настоящее время наиболее распространен метод мониторинга фотосинтетических организмов, основанный на записи и анализе индукционной кривой ФХ с амплитудно-импульсной модуляцией (РАМ) насыщающим светом. Методы мониторинга, основанные на ФХ, все чаще используются для характеристики производительности и стрессоустойчивости культур в биотехнологии микроводорослей. Анализ кривых индукции ФХ демонстрирует пути утилизации световой энергии, поглощаемой фотосинтетическим аппаратом. В частности, этот метод показывает, сколько энергии было использована для фотохимических реакций (инвестировано в рост культуры), а сколько — рассеяно в виде тепла фотозащитными механизмами. Следовательно, кривая индукции ФХ и производные от нее параметры (в совокупности известные как ЛР-тест) являются довольно точными показателями метаболической активности фотосинтезирующей клетки и степени индукции фотозащитных механизмов. Эта информация является солидной основой для принятия информированных решений по управлению культурами микроводорослей при выращивании в лабораторных и промышленных масштабах. Области применения ФХ и РАМ включают мониторинг воздействия стрессоров (высокая освещенность, недостаток питательных веществ, экстремальные температуры и т.д.) для оценки устойчивости культуры. Он также служит в качестве неинвазивного экспресс-теста для определения действия различных токсикантов на клетки микроводорослей. Этот подход получает все более широкое распространение в экологической токсикологии и экологической биотехнологии, особенно для тестирования штаммов, способных разрушать опасные загрязнители, такие как фармацевтические препараты. В докладе обсуждаются преимущества и недостатки использования методов, основанных на CF, для оценки условий культивирования. Особое внимание уделяется потенциальным рискам и области применимости различных вариантов измерений ФХ и РАМ для решения проблем биотехнологии микроводорослей.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФ (гранты 2-23-74-00037, 21-74-20004, 23-44-00006).

ИНТЕНСИВНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПУРПУРНЫХ НЕСЕРНЫХ БАКТЕРИЙ

High-density cultivation of purple non-sulfur bacteria

Полина Старыгина, Ольга Чудакова, Анатолий Цыганков

ИФПБ РАН, обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, ул.
Институтская, д. 2, г. Пушкино, Московская обл., 142290, Россия

*e-mail: staryginapolina@yandex.ru, тел. +7 496 7732791

Пурпурные несерные бактерии (ПНСБ) – аноксигенные фотосинтезирующие микроорганизмы с чрезвычайно гибким метаболизмом, что позволяет им расти в самых разных условиях, а также в присутствии различных загрязняющих веществ [1]. Получение интенсивных культур ПНСБ с большим выходом биомассы является актуальной задачей, так как клетки данных бактерий могут применяться в очистке сточных вод, а также содержат бактериохлорофилл *a*, 5-аминолевулиновую кислоту, кофермент Q10, полигидроксилаканоаты, жирные кислоты, каротиноиды, АТФ, НАДН [2]. Эти вещества используются в медицине, косметологии, сельском хозяйстве, пищевой промышленности и других областях.

Целью работы являлась отработка способа интенсивного культивирования пурпурных несерных бактерий, относящихся к родам *Cereibacter*, *Rubrivivax*, *Rhodovulum* и *Rhodopseudomonas*.

Культивирование проводили продленным периодическим способом в биореакторе типа АНКУМ объемом 15 л. Титрующей средой служил концентрированный раствор необходимых питательных элементов, при этом в качестве органического субстрата служила смесь уксусной и молочной кислот. Применение органических кислот позволило автоматизировать подачу среды-титранта, так как их потребление приводит к повышению рН культуральной жидкости, причем изменение рН зависит от скорости роста культуры и скорости удаления углекислого газа. Использовали ранее подобранный состав среды для выращивания *Cereibacter sphaeroides* [3] с последующей модификацией для других бактерий. Подбор среды основывался на изучении потребления компонентов среды и корректировки среды-титранта для выяснения недостающих и избыточных компонентов. Потребление компонентов определяли как разницу между количеством веществ, поступившим в реактор, и количеством, оставшимся в культуральной жидкости.

Показано, что для интенсивного культивирования культур родов *Rubrivivax* и *Rhodovulum* полностью подходит титрант, подобранный для *Cereibacter sphaeroides*. Для бактерии рода *Rhodopseudomonas* в процессе роста культуры наблюдали значительное накопление веществ в культуральной жидкости. Для интенсификации культивирования данной бактерии также пересчитывали состав титрующей среды аналогично способу пересчета для *Cereibacter sphaeroides*.

В результате были получены интенсивные культуры пурпурных несерных бактерий родов *Cereibacter*, *Rubrivivax*, *Rhodovulum* с содержанием сухой биомассы 50-62 г/л. Для бактерии рода *Rhodopseudomonas*, вследствие ее малой скорости роста, потребовалось понизить pH среды-титранта.

Работа выполнена в рамках ГЗ № 122041200039-0.

1. Cerruti M. Harnessing the metabolic versatility of purple non-sulfur bacteria: – Thesis, Delft University of Technology, 2022.
2. Cao K. Bioresource Technology photosynthetic bacyceria wastewater treatment with the production of value-added products: a review / Cao K., Zhi R., Zhang G. // Bioresour. Technol. -2019- P. 122-648.
3. Чудакова О.О. Пурпурная несерная бактерия *Cereibacter sphaeroides* – продуцент бактериохлорофилла а и ее интенсивное культивирование. / Чудакова О.О. Старыгина П.А., Хуснутдинова А.Н., Лауринавичене Т.В., Грин М.А., Миронов А.Ф., Филоненко Е.В., Цыганков А.А. // Биотехнология, 38 (4), с. 7–15 (2022).

ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ ПУРПУРНОЙ СЕРНОЙ БАКТЕРИИ *THIOCAPSA BOGOROVII* BBS КОМПЛЕКСА, СПОСОБНОГО К ОБРАЗОВАНИЮ СЕРОВОДОРОДА ИЗ СЕРЫ В ПРИСУТСТВИИ ВОДОРОДА И СОДЕРЖАЩЕГО H₂DSL ГИДРОГЕНАЗУ

Isolation from purple sulfur bacterium *Thiocapsa bogorovii* BBS of the complex capable of disulfide production from elemental sulfur and molecular hydrogen and containing H₂DSL hydrogenase

Махмадюсуф Хасимов^{1*}, *Моисеева Мария*², *Александр Стародубов*¹,
*Николай Зорин*¹, *Ольга Сердюк*¹,
*Екатерина Петушкова*¹, *Анатолий Цыганков*¹

¹Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН

²Тульский государственный университет

*e-mail: hasimov94@mail.ru, тел. +7 988 0634542

Современный мир стал все более заинтересованным в проблемах эффективного использования энергоресурсов и поиске возобновляемых источников энергии. Это связано с ограниченностью и исчерпанием геологических запасов нефти и газа, а также увеличением негативного влияния экологических факторов. Возобновляемым источником энергии может служить биоводород. Одним из перспективных направлений в развитии водородной энергетики является использование фермента H₂DSL-гидрогеназы в топливных элементах, позволяющих получать из водорода электрический ток (E.S. Shastik et.al, 2011).

Предыдущие исследования показали, что гидрогеназа H₂DSL, найденная в *T. bogorovii* BBS, играет ключевую роль в уникальной реакции восстановления элементарной серы до сероводорода (Laurinavichene et al. 2007). Предполагается, что в этом процессе участвуют, наряду с H₂DSL-гидрогеназой, и isp1 и Isp2 белки, гены которых расположены в одном опероне с гидрогеназными. Ранее было установлено, что сохранение ферментативной активности комплекса при разрушении клеток возможно благодаря поддержанию высокой ионной силы раствора (Khasimov et. al., 2021). Использование этого свойства при разрушении клеток позволило нам подобрать условия выделения нативного H₂DSL-гидрогеназного комплекса.

Этапы выделения включали: разрушение клеток ультразвуком в присутствии 10 г/л NaCl; обработка экстрактов ДНКазами для удаления геномной ДНК; высокоскоростное центрифугирование с отбором мембранной фракции; солнобулизация комплекса из клеточных мембран тритоном X-100; ультрацентрифугирование с последующей ионообменной хроматографией на Q-сефарозе; гельфильтрация на Супердексе 200 и вертикальный электрофорез в неденатурирующих условиях.

При выделении HydS-гидрогеназного комплекса наблюдаются значительные потери на стадиях высокоскоростного центрифугирования, обработки детергентом и ультрацентрифугирования, которые составляют почти 80% от количества в целых клетках, определяемого по реакции комплекса в восстановлении серы до сероводорода. Около 25% активности комплекса сохраняется после ионообменной хроматографии и примерно 33% - после гель-фильтрации.

В итоге по удельной активности комплекса удалось очистить его в 311 раз. Полученные образцы ферментного комплекса были переданы для протеомного масс-спектрометрического анализа. Результаты обсуждаются в рамках данной работы.

Литература.

1. Khasimov MK, Petushkova EP, Khusnutdinova AN, Zorin NA, Batyrova KA, Yakunin AF, Tsygankov AA (2021) The HydS C-terminal domain of the *Thiocapsa bogorovii* HydS hydrogenase is involved in membrane anchoring and electron transfer. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1862(12): 1484-1492. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2021.148492>
2. Laurinavichene T.V. The effect of sulfur compounds on H₂ evolution/consumption reactions, mediated by various hydrogenases, in the purple sulfur bacterium, *Thiocapsa roseopersicina* / Laurinavichene T.V., Rakhely G., Kovacs K.L., Tsygankov A.A. // *Archives of Microbiology*. – 2007. – Vol. 188. – P. 403-410
3. Shastik E.S., Vokhmyanina D.V., Zorin N.A., Voronin O.G., Karyakin A.A., Tsygankov A.A. Demonstration of hydrogenase electrode operation in a bioreactor // *Enzyme Microb Technol*. 2011. Vol.49(5), pp. 453-458.



ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИЕ ПУРПУРНЫЕ БАКТЕРИИ И ИХ ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

А.А. Цыганков

ИФПБ РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино,
Московская обл., Институтская, 2

e-mail: ttt-00@mail.ru

Фотосинтезирующие пурпурные бактерии можно обнаружить в теплых лужах, микробных матах горячих источников, в эстуариях морей и даже в водах, сопутствующих нефтяным пластам. Пурпурные несерные бактерии обладают удивительной пластичностью метаболизма. Среди них есть пресноводные виды и обитатели морских вод. Они могут расти в хемогетеротрофных условиях за счет кислородного, а подчас и нитратного дыхания. Эти бактерии способны к брожению, используя для этого процесса простые сахара. Они способны к аноксигенному фотосинтезу с использованием более восстановленных чем вода соединений: простые органические кислоты, восстановленные соединения серы, молекулярный водород и даже металлы. Практически все пурпурные бактерии способны к азотфиксации.

Несмотря на высокую скорость роста, в промышленности пурпурные бактерии практически не применяются. При этом они являются основными продуцентами бактериохлорофиллов, содержат различные каротиноиды, убихиноны, синтезируют аминоклевулиновую кислоту и могут накапливать полигидроксиалканаты в качестве запасных соединений. Некоторые гидрогеназы пурпурных бактерий обладают удивительной стабильностью и рассматриваются в качестве заменителей платины в топливных элементах. Известны примеры применения пурпурных бактерий в качестве хозяинов для гетерологичной экспрессии различных ферментов. Доклад посвящен описанию практических возможностей пурпурных бактерий и попытке определить основные факторы, препятствующие их практическому использованию.

Работа поддержана грантом РФФ №19-14-00255.

**МЕТОД КОМПЛЕКСНОГО ВЫДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ
СОЕДИНЕНИЙ ИЗ БИОМАССЫ ПУРПУРНЫХ НЕСЕРНЫХ БАКТЕРИЙ**

**Method for simultaneous isolation of biologically valuable compounds from purple
non-sulfur bacteria biomass**

*Ольга Чудакова**, Александр Ашихмин,
Полина Старыгина, Анатолий Цыганков

ИФПБ РАН, обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН,
ул. Институтская, д. 2, г. Пушкино, Московская обл., 142290, Россия

*e-mail: chuda94@yandex.ru, тел. +7(4967)732791

Пурпурные несерные бактерии (ПНСБ) являются продуцентами различных биологически значимых соединений, включая бактериохлорофилл *a* (Бхл *a*), каротиноиды (Кар), убихиноны (в частности, коэнзим Q10 (КоQ10)), жирные кислоты (ЖК), белок. Они могут применяться в медицине, косметологии, сельском хозяйстве, пищевой промышленности и других областях. Большинство существующих методик нацелено на выделение отдельных соединений, а в некоторых используются жесткие условия, которые предполагают разрушение «побочных» продуктов. Технология их совместного получения позволит сделать выращивание и обработку биомассы рентабельным, а отработанная высушенная биомасса может найти применение в качестве кормовой добавки для аквакультуры или животноводства/птицеводства.

Целью данной работы было подобрать методику экстракции и хроматографического разделения жирорастворимых веществ, позволяющую получить чистые Бхл *a*, Кар, КоQ10 и ЖК из биомассы клеток ПНСБ.

В работе использовали биомассу клеток *Cereibacter sphaeroides*. Были исследованы различные методики экстракции. Показано, что разрушение клеток ПНСБ ультразвуком не приводит к увеличению содержания жирорастворимых веществ в экстракте. Также было проверено три способа экстракции: ацетон-метанольная [1]; модифицированный метод экстракции липидов Bligh&Dyer [2]; метод с использованием системы растворителей гексан-изопропанол [3]. Установлено, что экстракция в системе гексан-изопропанол в течение 15 мин при 50 °С в темноте является наиболее эффективной, так как в данном

случае в растворитель выходят все указанные соединения и не происходит окисления Бхл *a* до бактериофеофитина кислородом воздуха, а также его окисления на свету.

Для дальнейшего разделения полученного экстракта применяли колоночную хроматографию с использованием силикагеля в качестве носителя (размер частиц 63-200 мкм), в системе растворителей гексан:ацетон с соотношением 93:7 (v/v). В результате удалось получить три фракции – ЖК, смесь Кар и КоQ10, а также Бхл *a*.

На следующей стадии проводили разделение Кар и КоQ10 методом ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой C18 при 40 °С [4]. В качестве подвижной фазы использовали смесь растворителей ацетонитрил:этанол в соотношении 3:1 (v/v). Выбранная методика применима для поставленной задачи, так как времена выхода с колонки Кар и КоQ10 существенно отличаются.

В результате работы была подобрана методика экстракции и дальнейшего разделения Бхл *a*, Кар, КоQ10, а также ЖК из биомассы ПНСБ. Отработанная биомасса также может использоваться в качестве добавки для подкормки аквакультур, птиц или животных, а супернатант – как удобрение для растений. Таким образом, данная методика может быть использована для разработки безотходной технологии разделения биомассы ПНСБ с выделением ряда ценных соединений в чистом виде.

Работа выполнена в рамках ГЗ № 122041200039-0.

1. Clayton R.K. / *Photochemistry and Photobiology*. 1966; 5:679–688.
2. Bligh E.G., Dyer W.J. / *Can J Biochem Physiol*. 1959;37(8):911–917.
3. Senorans M. et al. / *Molecules*. 2020;25:3310
4. Ashikhmin A. et al. / *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. 2017;170:99–107.

Секция 8. ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ФОТОБИОЛОГИЯ

НОВЫЕ ПРИБОРЫ ДЛЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ И БИОИНДИКАЦИИ

New instruments for biotesting and bioindication

Тарас Антал^{2}, Иван Конюхов¹, Алена Волгушева¹,
Сергей Хрущев¹, Татьяна Плюснина¹*

¹Биологический факультет Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова

²Лаборатория комплексных экологических исследований
Псковского государственного университета

**e-mail: taras_an@mail.ru, тел. +7 925 0688560*

Фотосинтетическая активность фитопланктона является одним из ключевых индикаторов состояния водной экосистемы. В связи с этим существует необходимость создания высокочувствительных оптических приборов и алгоритмов математического анализа данных, позволяющих быстро и качественно оценивать данный показатель. К таким методическим подходам предъявляются следующие основные требования: высокая чувствительность к стрессовым факторам и возможность проведения измерений в режиме реального времени в широком диапазоне концентраций хлорофилла.

Коллективом авторов кафедры биофизики биологического факультета МГУ им. Ломоносова и лабораторией комплексных экологических исследований Псковского государственного университета разработаны две измерительные установки на основе оригинального компактного флуориметра “Fluorescence kinetic system”, позволяющего измерять три типа кинетических кривых флуоресценции хлорофилла с высоким временным разрешением: ОЛР кривые, индукционные кривые замедленной флуоресценции, кинетики затухания быстрой флуоресценции. Измерения проводятся в широком диапазоне концентраций хлорофилла: от 0.1 мкг Хл/л до 10 мг Хл/л.

Первая установка – ‘Portable spectral and fluorescence kinetic system’ – снабжена флуориметром и спектрофотометром с проточной измерительной камерой в виде интегрирующей сферы. Она предназначена как для биотестирования образцов воды с использованием зеленых микроводорослей в качестве тест-культур, так и для биоиндикации состояния водоемов.

Вторая установка - ‘Automatic fluorescence kinetic system’ – предназначена для непрерывной работы в автоматическом режиме в полевых условиях, позволяя проводить забор проб из водоема, измерять кинетические кривые флуоресценции хлорофилла и обеспечивать обмен данными с сервером дистанционно посредством мобильной связи.

Для обработки данных разработаны алгоритмы мультиэкспоненциального анализа, позволяющие с высокой точностью определять параметры компонент кинетических кривых, а также оригинальные методы нейросетевого анализа. Разработанные приборы и методы анализа данных успешно апробированы в ходе нескольких исследовательских проектов (1, 2).

Работа была поддержана Российским научным фондом (грант № 23-24-00353).

1. Volgusheva et al. (2022) Acclimation response of green microalgae *Chlorella sorokiniana* to 2,3',4',6-pentachlorobiphenyl. *Photochemistry and Photobiology*, doi: 10.1111/php.13771
2. Хрущев С. и др. (2021) Выявление токсического воздействия тяжёлых металлов на фитопланктон с помощью нейросетевого анализа индукционных кривых флуоресценции хлорофилла. *Теоретическая и прикладная экология*, doi: <http://dx.doi.org/10.25750/1995-4301-2021-2-134-141>

**ANALYSIS OF THE ROLE OF THE GREEN CANOPY OF FORESTS AND THE
IMPACT OF WOOD USE METHODS ON THE BALANCE OF C-CO₂ EARTH'S
ATMOSPHERE**

Gennady Bulatkin

Institute of Basic Biological Problems RAS

e-mail: genbulatkin@yandex.ru tel. +7 967 2781789

According to the FAO [1], the world's forests store 662 billion tons of carbon, of which 44.5% is biomass. In the Paris Climate Agreement, forests play a major role in reducing CO₂ levels in the atmosphere. During the growing season, managed forest stands absorb a huge amount of CO₂, ten times greater than emissions due to direct and indirect costs of technical energy [2]. The green forest canopy is a collection of tree crown leaves located in one or more tiers and playing a major role in the absorption of CO₂ from the atmosphere. The generally accepted calculation of C-CO₂ fluxes in forests leads to the conclusion that with an increase in planting area and their productivity, the runoff of carbon dioxide from the atmosphere increases sharply. Based on this approach, country-by-country carbon balances are compiled and emissions trading are proposed. However, further, deeper consideration of the fate of wood in time leads to a different conclusion.

We have developed *a methodology and proposed a new three-stage method for calculating the C-CO₂ balance when growing forests and using wood* [3]. The mode of use of industrial wood is essential in the release of carbon dioxide into the atmosphere. The service life of buildings made of wood fluctuates slightly and averages about 50 years. After this period of time, buildings are usually dismantled, the remains of wood are either burned or partially used for a short time on the farm. Thus, the positive impact of forest planting on reducing the concentration of carbon dioxide in the atmosphere when wood is used only in construction will not be significant due to the short period of operation of structures. Eventually, the former timber will rot and turn back into CO₂. Part of the wood is used to make paper, cardboard, plywood, and furniture. However, these materials and products have a short life span. First of all, paper and cardboard are consumed. Furniture usually lasts no more than 25 years. Thus, the initial large carbon sink with industrial wood leads to a temporary (up to 150 years) removal of CO₂ from the atmosphere. The long-term cycle of C-CO₂ in the system atmosphere - green plants - industrial wood - man-made buildings dust- the atmosphere ends only with a small positive balance. It is known that only a small part – 0.8-1.0% of the organic matter

synthesized by plants enters the large geological cycle, transforms and is preserved for millions of years [4, 5].

However, there is a highly effective way of using forest plantations to regulate the content of carbon dioxide in the atmosphere, which is currently little paid attention – so-called substitution effect [6]. This path is the use of wood in housing construction, furniture production, and the replacement of reinforced concrete electric poles with wooden ones (figure). The effect of replacing energy-intensive materials with woods will be one of the main ways for the positive impact of forests on the CO₂ content in the atmosphere.

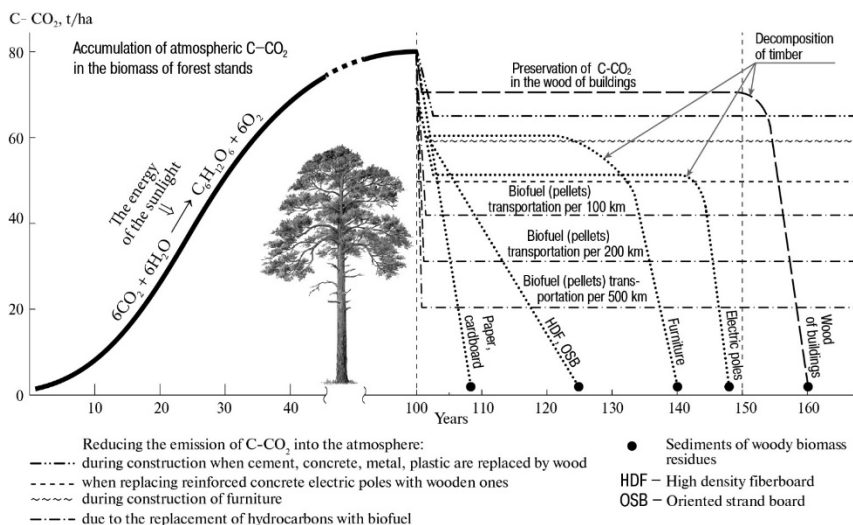


Figure. Scheme of a three-stage method for calculating the balance of C-CO₂ in the atmosphere when growing forests and using wood.

The use of wood from thinnings, wood processing residues and biomass from forests to produce heat and electricity is the big reserve in reducing the concentration of carbon dioxide in the Earth's atmosphere. The production of wood pellets and their use in the local region is an important part of the distribution power generation [7].

This path is the use of part of the wood for energy production and the replacement of fossil hydrocarbons.

Indeed, when wood is used for energy, biomass carbon burns out and also enters the atmosphere in the form of CO₂. In this case, carbon dioxide does not replenish the pollutant pool C-CO₂ simply recirculates. It is important to take into account that the transportation of biofuel from wood over long distances significantly reduces its energy efficiency and increases C-CO₂ emissions into the atmosphere (figure).

The work was supported by Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation project #122041200035-2.

References.

1. Global Forest Resources Assessment 2020. Main report. FAO: Rome, Italy. 2021. 184 p.
2. Bulatkin, G.A. Influence of the managed forests on CO₂ balance in the Earth's atmosphere // *Life of the Earth*. 2021. V. 43. #1, P. 54-66.
https://doi.org/10.29003/m1994.0514-7468.2020_43_1/54-66.
3. Bulatkin G.A. A new Model for Calculating the Impact of Forests and Wood Use on the Balance of C-CO₂ in the Earth's Atmosphere // *Environ. Sci. Proc.* 2022 (1) 28; [https://DOI: org/10.3390/IEECF2022-13040](https://DOI:org/10.3390/IEECF2022-13040)
4. Kovda V.A. Fundamentals of the of soils studies. Book. 1. M.: Science. 1973. 447 p. (in Russian).
5. Alpatiev A.M. Development, transformation and protection of the natural e environment. L.: Science. 1983. 239 p. (in Russian).
6. Knauf M., Kohl M., Mues V., Olschofsky K., Fruhwald A. Modeling the CO₂-effects of forests management and wood usage on a region basis // *Carbon Balance and Management*. 2015. V. 10: 1-11.
7. Smurov A.V., Sapovalov A. V. Energy and biosphere by V.I. Vernadsky // *Life of Earth*. 2023. T.45. #1. P. 4-14. (in Russian).

**ВЛИЯНИЕ 2,3',4,4',6-ПЕНТАХЛОРБИФЕНИЛА НА РОСТ И
ФОТОСИНТЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЗЕЛеноЙ МИКРОВОДОРОСЛИ
*CHLORELLA SOROKINIANA***

**Effect of 2,3',4,4',6-pentachlorobiphenyl on the growth and photosynthetic activity
of green microalgae *Chlorella sorokiniana***

*Алёна Волгушева¹, Дарья Тодоренко¹, Иван Конюхов¹, Елена Воронова¹,
Татьяна Плюснина¹, Сергей Хрущев¹, Тарас Антал^{2*}*

¹Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский
государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г.
Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

²Лаборатория комплексных экологических исследований, Псковский
государственный университет, Россия, 180000, Псков, пл. Ленина, д. 2

*e-mail: taras_anl@mail.ru, тел. +7 811 2201699

Полихлорбифенилы (ПХБ) представляют большую группу искусственно синтезированных органических соединений, токсические свойства которых определяются количеством и локализацией атомов хлора в молекуле токсиканта. ПХБ являются опасными загрязнителями, поскольку медленно разлагаются в окружающей среде, токсичны и канцерогенны [1]. Их широкое использование и неправильная утилизация привели к загрязнению окружающей среды. ПХБ хорошо растворимы в воде, легко проникают и накапливаются в клетках фитопланктона, что приводит к отравлению всей пищевой цепи. Чувствительность фитопланктонного сообщества к ПХБ значительно варьирует в зависимости от видового состава и физико-химических свойств токсиканта.

В работе исследовано влияние 2,3',4,4',6-пентахлорбифенила (ПХБ-119) на рост клеток, содержание хлорофилла (ХЛ) и активность первичных реакций фотосинтеза у автотрофной культуры *C. sorokiniana*. Выбор объекта связан с опубликованными в литературе данными о способности некоторых видов *Chlorella* метаболизировать ПХБ, что позволяет использовать этот вид водорослей в биоремедиации водоемов [2]. Концентрация 0,025 мкг/мл ПХБ-119 незначительно влияла на рост и фотосинтетическую активность культуры, однако значительно снижала содержание ХЛ на клетку. Данный результат позволяет предположить, что основной мишенью токсиканта являлся метаболизм ХЛ.

Увеличение концентрации до 0,050 мкг/мл приводило к деградации Хл, прекращению роста и гибели клеток. Комплексное использование

двух флуоресцентных методов: высокочувствительного флуориметра ФКМС-2 [3] позволяющего регистрировать ОЖР кривые, кинетики темного затухания флуоресценции, индукцию замедленной флуоресценции и флуоресцентного микроскопа для измерения F_0 и F_m на отдельных клетках позволило выявить 2–3% клеток, сохраняющих высокие значения F_v/F_m ($>0,7$) в присутствии 0,050 мкг/мл ПХБ-119. Обработанные ПХБ-119 культуры были способны к возобновлению роста после продолжительной инкубации на свежей среде без токсиканта.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00353).

1. Chatel G., Naffrechoux E., Draye M.: Avoid the PCB mistakes: A more sustainable future for ionic liquids. – *J. Hazard Mater.* **15**: 773-780, 2017.
2. Chekroun K.B., Sánchez E., & Baghour M.: The role of algae in bioremediation of organic pollutants. – *Int. Res. J. Pub. Environ. Health* **1**: 19-32, 2014.
3. Antal T., Konyukhov I., Volgusheva A. *et al.*: Chlorophyll fluorescence induction and relaxation system for the continuous monitoring of photosynthetic capacity in photobioreactors. – *Physiol. Plant.* **165**: 476-486, 2018.
4. Kuznetsov A.G., Konyukhov I.V., Pogosyan S.I. *et al.*: Microfluorimeter for Studying the State of Photosynthetic Apparatus of Individual Cells of Microalgae. – *Oceanology* **61**: 1055-1063, 2021.

**ВЛИЯНИЕ ВОДНОГО ДЕФИЦИТА НА ПАРАМЕТРЫ ТИПИЧНОГО И
МОДИФИЦИРОВАННЫХ**

PRI Influence of water deficit on parameters of typical and modified PRI

*Юрий Золин**, Екатерина Сухова, Любовь Юдина, Алёна Попова,
Анастасия Киор, Владимир Сухов

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23

*e-mail: Uchebnayap.zolin@gmail.com, тел. +7 987 7527063

Методы неинвазивного дистанционного мониторинга состояния высших растений, такие как мульти- и гиперспектральный имиджинг отражённого света, крайне перспективны для оценки стрессовых изменений фотосинтетического аппарата высших растений; в частности, значительный интерес представляет возникновение пространственной неоднородности распределения таких индексов. Типичный фотохимический индекс отражения (PRI), базирующийся на измерении отражённого света на длинах волн 531 нм (измерительная длина волны) и 570 нм (референсная длина волны), и его модифицированные варианты, опирающиеся на измерительные длины волн 510 и 546 нм, являются перспективными инструментами для выявления стрессовых изменений у растений. Целью настоящей работы был анализ влияния водного дефицита на средние значения и пространственную неоднородность типичного и модифицированных PRI.

Измерения PRI осуществляли у проростков гороха посевного с использованием разработанных совместно с Институтом Прикладной Физики РАН базовой (измерение только типичного PRI) и модифицированной (измерение типичного и модифицированных PRI) систем регистрации пространственного распределения фотохимического индекса отражения. В ходе исследования было показано, что развитие водного дефицита приводит к снижению как типичного, так и модифицированных PRI, однако, изменения модифицированных PRI регистрировались на более ранних стадиях стрессового воздействия. Длинноволновые модификации PRI показывали стабильное снижение, а коротковолновые - возрастали; при этом, изменения типичного PRI могли быть направлены как в положительную, так и отрицательную сторону.

Для исследования влияния водного дефицита на пространственную неоднородность было рассмотрено его влияние на стандартное отклонение (SD) типичного и модифицированных PRI в рамках отдельных ROI. Было показано, что действие стрессора приводило к значительному возрастанию SD всех типов PRI, что показывает возможность использования такого изменения как маркера стрессовых изменений.

Далее был выполнен анализ влияния размеров ROI на значения параметров PRI. Были исследованы ROI большого (28 пикселей), среднего (20 пикселей) и маленького (15 пикселей) размера; какое-либо влияние размера ROI на средние значения и SD PRI выявлено не было.

Таким образом, полученные результаты показывают, что средние величины и параметры пространственной неоднородности PRI могут быть использованы в качестве показателя влияния водного дефицита на растения гороха; при этом, выявление механизмов изменений параметров PRI требует развития комбинированной оптической и фотосинтетической модели листа. Экспериментальные изменения, показанные в настоящей работе, являются основой для параметризации и верификации подобной модели.

Работа была выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-14-00127).

**ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКИ ДЕЙСТВУЮЩЕГО ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ
НА ИНДУЦИРОВАННУЮ ЭЛЕКТРИЧЕСКИМИ СИГНАЛАМИ УСТОЙЧИВОСТЬ
К ЗАСУХЕ У РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ**

**Effect of chronic ionizing radiation on electrical signal-induced drought resistance
in wheat plants**

А.В. Иванова, Ю.А. Немцова, В.А. Воденев, М.А. Гринберг*

Университет Лобачевского, 603022,
Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23

**e-mail: zelenkaeee@gmail.com, тел. +7 966 7035686*

Все живые организмы, в том числе растения, во время роста и развития подвергаются воздействию факторов среды. Ионизирующее излучение (ИИ) является как неотъемлемой составляющей среды обитания всего живого, так и хронически действующим стрессором, в случае превышения фоновых значений. На загрязнённых радионуклидами территориях, помимо влияния ИИ растения могут подвергаться действию ряда других стрессоров таких как засуха, переувлажнение, неблагоприятные температуры и т.д. За повышение устойчивости к таким изменениям отвечают сигнальные системы, которые у растений представлены электрическими, гидравлическими и различными химическими сигналами. В условиях комбинированного действия стрессоров параметры сигналов и формируемой ими устойчивости могут меняться. Ранее в работах кафедры было показано, что ИИ усиливает электрические сигналы (ЭС) и вызываемые ими ответы фотосинтеза и транспирации.

Целью настоящей работы являлось изучение влияния хронически действующего ИИ на индуцированную ЭС устойчивость к засухе у растений пшеницы.

В работе рассматривалось влияние на параметры фотосинтеза и транспирации хронического облучения, засухи, комбинации этих факторов, а также анализировалась протекторная функция ЭС у растений, выращенных при естественном и повышенном уровне радиационного фона. Исследования проводились на проростках пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.). В качестве источника ИИ использовался β -излучатель ^{90}Sr - ^{90}Y , растения облучались на протяжении всего периода выращивания с мощностью дозы примерно 31,3 мкГр/час. Засуха задавалась прекращением полива растений в возрасте 14 дней. ЭС

индуцировался в первый день засухи нагревом кончика листа в кювете с водой. Активность фотосинтеза и транспирации оценивалась при помощи методов РАМ-флуориметрии и ИК-термографии. ЭС регистрировались при помощи макроэлектродной техники. Измерения уровня фотосинтеза и транспирации проводились два раза в сутки на протяжении всего периода развития ответов на засуху.

Показано, что у контрольных и облученных растений засуха вызывает снижение параметров фотосинтеза и подавление интенсивности транспирации, однако сроки наступления таких эффектов в разных группах отличаются. В условиях хронического облучения малыми дозами происходит стимуляция активности фотосинтеза и интенсивности транспирации у растений пшеницы, что ведёт к более быстрому снижению этих показателей при водном дефиците. ЭС практически не оказывают влияние на уровень фотосинтеза и транспирации в условиях достаточного полива, но повышают устойчивость растений пшеницы к действию засухи как при естественном, так и при повышенном уровне радиационного фона. Обнаружено, что облучение усиливает вызванную ЭС устойчивость к засухе у растений пшеницы

Работа выполнена в рамках проекта Национального центра физики и математики (НЦФМ) «Экспериментальная лабораторная астрофизика и геофизика» и проекта № 075-15-2021-1068 Минобрнауки.

**КОМПЛЕКС FRR (FAST REPETITION RATE) ФЛУОРИМЕТРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ
СОСТОЯНИЯ РАСТЕНИЙ В ПРИРОДНОЙ СРЕДЕ И ФОТОБИОРЕАКТОРАХ**

*Иван Конюхов**, *Сергей Погосян*

МГУ имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет,
кафедра биофизики

**e-mail: vanka.kon@gmail.com, тел. +7 916 7900931*

Регистрация флуоресценции хлорофилла – один из основных методов анализа физиологического состояния растений. С его помощью решаются фундаментальные вопросы по молекулярной и пространственной организации фотосинтеза, о его работе и регуляции. Сочетая в себе высокую чувствительность, быстроту и удобство измерений, этот метод находит применение и в прикладных областях - в экологических исследованиях по фитопланктону, лишайникам и высшим растениям и в области фотобиотехнологии.

Измерение флуоресценции хлорофилла возможны по разным протоколам возбуждения. В лабораторной работе с высшими растениями и культурами микроводорослей наиболее универсальны приборы немецкой фирмы Walz, работающие по технологии РАМ (pulse amplitude modulation). Однако общим недостатком этих приборов является их относительно низкая чувствительность при малом содержании хлорофилла. Поэтому в работе с природным фитопланктоном (низкое содержание пигментов) и в случае сильных помех, например, в открытых измерительных камерах на фоне солнечного света, требуются альтернативные способы измерений.

В докладе обсуждаются преимущества технологии возбуждения и детектирования сигнала флуоресценции FRR (fast repetition rate) в контексте измерений *in situ* на свежесобранных пробах природной воды и на листьях и побегах высших растений. На примерах из собственной практики показаны экспериментальные возможности FRR-флуориметров в прикладных исследованиях – определение содержания хлорофилла, измерения кривых индукции флуоресценции (ОЛП), световых кривых скорости электронного транспорта (rETR) и нефотохимического тушения (NPQ), оценка устойчивости к фотоингибированию и скорости восстановления от фотоингибирования, оценка токсичности водной среды в опытах по биотестированию.

Представлены флуориметры различного назначения, созданные на кафедре биофизики Биологического факультета МГУ и в которых

возбуждение осуществляется по технологии FRR. Комплекс приборов включает:

- флуоресцентный FRR-микроскоп для анализа процессов фотосинтеза в одиночных клетках;
- приборы для культур водорослей и биотестирования Smart 2 и Tubby FRR;
- приборы для проб природной воды Smart 3 и Smart 8;
- станция мониторинга фитопланктона на базе Smart 8 в варианте с проточной кюветой;
- прибор без затемненной камеры (открытого типа) Smart 4 для измерений *in situ* на листьях и лишайниках, а также в культурах водорослей – в колбах, чашках Петри или непосредственно внутри освещенного фотобиореактора через его прозрачную стенку;
- лазерный флуориметр всепогодного исполнения для автоматизированных круглогодичных измерений флуоресценции на молодых побегах высших растений.

В проекте – построение FRR-лидара для определения показателей флуоресценции при значительном расстоянии до объекта (от 1 метра и более) для нужд сельского хозяйства и экологического мониторинга.

Работа была поддержана фондом РФ (грант № 22-11-00009).

**ИЗУЧЕНИЕ МНОГОКОМПОНЕНТНОЙ СМЕСИ ПИГМЕНТОВ
МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ИЗ МОРСКОГО МЕРО-МИКТИЧЕСКОГО ОЗЕРА КИСЛО-
СЛАДКОЕ МЕТОДОМ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ**

**Fluorometric characterization of multicomponent mixture of microalgae pigments
from a coastal meromictic lake Kislo-Sladkoe**

*Лапуца Коннель, Елена Краснова**

Биологический факультет МГУ

*e-mail: e_d_krasnova@mail.ru

Меромиктические озера характеризуются стабильной стратификацией и сложной вертикальной структурой из слоев воды с разными физико-химическими свойствами (соленость, температурный режим, концентрация растворенного кислорода), разделенных градиентными зонами. Существенно различаются и световые условия на разной глубине. Озеро Кисло-Сладкое – отделившийся от Белого моря водоём на полуострове Киндо в районе Беломорской биологической станции МГУ – зонирован следующим образом: верхний слой воды до глубины 1 м опреснённый, ниже соленость возрастает до уровня морской; верхний 1 м насыщен растворённым кислородом, но максимума его содержание достигает примерно на горизонте 2 м; ниже концентрация O₂ уменьшается, и на глубине 3,5 м условия становятся анаэробными, преобладает сероводород [1]. В хемоклине (зоне перехода от аэробной зоны к анаэробной) есть прослойка из окрашенной воды с массовым развитием фототрофных микроорганизмов: выше редокс-перехода – цветение водорослей, ниже – слой из аноксигенных фототрофных бактерий. Состав фототрофов в верхней опресненной, нижней соленой водной массе и в хемоклине, соответственно, их пигментный состав различается [3]. Целью данного исследования было изучение различий пигментного состава в популяциях микрофототрофов из водных слоев озера Кисло-Сладкое. Пробы отбирали в июле 2022 года погружным насосом с глубин от 0,5 до 3,6 м. Темноадаптированные пробы воды без концентрации и экстракции пигментов замораживали и хранили при -20°C, перед спектральными измерениями аликвоты замораживали до -196оС. Спектры низкотемпературной флуоресценции в образцах записывали на спектрофлуориметре Fluogomax-4P (Hogiba) при селективном возбуждении нативных пигментов микроорганизмов (хлорофиллы (хлф), фикобилипротеины (фбп), бактериохлорофиллы (бхл)). В приповерхностном слое на глубине 0,5 м обнаружены

длинноволновые хлф цианобактерий, бхл *a*, *c*, *d*, фикоэритробилин. На глубине 1,5 м появляется хлф *a*, преимущественно в составе ФСЦ. В аэробной зоне до глубины 2,5 м растет уровень хлф *a*, бхл и фбп увеличиваясь в 1,5 раза. Особняком стоит слой с глубины 3,5 м (хемоклин): в нем наибольшая концентрация хлф *a*, высокий уровень фбп, вся энергия с пигментов передается на коровый комплекс ФСЦ. Пробы с глубины 3,6 м наиболее богаты фбп, уровень хлф *a* снижен в 3 раза по сравнению с предыдущим слоем, в результате чего наблюдается несовершенная передача энергии от фикобилисом на хлф. Полученные результаты хорошо согласуются с данными микроскопирования проб: доминирование цианобактерий в поверхностном слое, (мелкие) зеленые жгутиконосцы на глубине 1,5-2,5 м, в хемоклине (3,5-3,6 м) характерная прослойка воды с цветением криптофитовых водорослей *Rhodomonas* [3]. Таким образом, метод низкотемпературной флуоресценции благодаря своей высокой чувствительности и разрешающей способности позволяет обнаружить низкие концентрации пигментов без концентрирования образцов и без экстракции пигментов в органических растворителях, т.о. обеспечивает *de facto* спектральный метаанализ флуоресцирующих пигментов микроорганизмов *in vivo*. Пигментный состав исследованных проб свидетельствует о филогенетической адаптации фитопланктонных сообществ на разных глубинах.

1. Краснова и др., 2016, Труды ББС МГУ, 12, 211-241.
2. Иванова и др., 2022, Океанология, 62, 1-15.
3. Krasnova et al., 2018, Chin J Oceanology & Limnology, 6, 1–16.

**СВЯЗЬ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА СВЕТА В МЕРОМИКТИЧЕСКИХ
ВОДОЕМАХ НА ПОБЕРЕЖЬЕ БЕЛОГО МОРЯ С ПИГМЕНТНЫМ СОСТАВОМ
ФОТОТРОФОВ В ЗОНЕ ХЕМОКЛИНА**

**Spectral composition of light in the chemocline of meromictic waterbodies of
White Sea may determine pigment composition of phototrophic organisms**

Елена Лабунская^{1}, Валентин Лобьшиев², Дарья Иванова¹,
Дмитрий Воронов³, Елена Краснова¹*

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
физический факультет

³Институт проблем передачи информации РАН

*e-mail: styxelenalab@gmail.com, тел. +7 925 4880833

Извилистая береговая линия Белого моря и продолжающееся послеледниковое поднятие берега создают условия для отделения заливов и лагун от моря и их превращения в полуизолированные стратифицированные водоемы с морской водой на дне и опресненным верхним слоем. Из-за разницы в плотности слои воды в них не перемешиваются, возникают градиенты солености, температуры, содержания кислорода. В придонной зоне обычно возникает сульфидная аноксия. На границе раздела аэробной и анаэробной зон, в хемоклине, есть прослойка окрашенной воды с фототрофными микроорганизмами [1]. Влияние градиентов абиотических факторов на распределение биоты активно изучают [2], однако спектральный состав света в толще воды до недавнего времени не был исследован, и влияние этого фактора на состав организмов не оценено. В предыдущей работе мы определили спектральный состав в зоне хемоклина и показали, что в более изолированных водоемах до зоны хемоклина доходит красная и дальняя красная часть спектра, тогда как в менее изолированных – преимущественно зеленый свет [3]. Для оценки пигментного состава фототрофов в хемоклине мы определили максимумы поглощения пигментов по спектрам поглощения ацетоновых экстрактов. Оказалось, что одинаковый цвет хемоклина в разных водоемах может определяться пигментами организмов, таксономически далеких друг от друга, но схожих по спектральным характеристикам. В хемоклине морских лагун (на Зеленом Мысе и в оз. «Кисло-Сладкое»), получающем свет 510 – 670 нм, в составе антенн были либо пигменты криптофитовых водорослей

фикоэритрин-545 и аллоксантин, либо бактериальный океон, их максимумы поглощения *in vivo* попадают в указанный диапазон. Для хемоклина более изолированного меромиктического озера Трехцветное с пресным верхним слоем воды характерен бактериохлорофилл *d* (715-745 нм *in vivo*) и сдвиг диапазона проходящего света в красную и дальнюю красную область. Мы предполагаем, что сообщества фототрофов со структурно различными антеннами, но схожими диапазонами для улавливания света могут формироваться под давлением такого фактора, как спектр света, доступного этим организмам в хемоклине.

1. E. D. Krasnova. Ecology of meromictic lakes of Russia. 1.Coastal marine waterbodies. *Water Resources*, 48(3):427–438, 2021.
2. D. A. Ivanova, E. D. Krasnova, D. A. Voronov, I. G. Radchenko. Seasonal dynamics of algal flora in the stratified Kисло-Sladkoe lake partially separated from the White Sea. *Oceanology*, 62(2):207–220, 2022.
3. Е. Д. Краснова, Е. А. Лабунская, В. И. Лобышев, Д. А. Воронов. Новые данные о беломорских прибрежных водоемах, отделяющихся от Белого моря. XIV Всероссийская конференция с международным участием Проблемы изучения, рационального использования и охраны природных ресурсов Белого моря, сборник тезисов, с. 27–27. ЗИН РАН Санкт-Петербург, Россия, 2022.

ВЛИЯНИЕ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ НА БАКТЕРИОФАГИ С НЕКАНОНИЧЕСКИМИ ОСНОВАНИЯМИ, ВЫДЕЛЕННЫМИ ИЗ СТОЧНЫХ ВОД Г. ПУЩИНО

А.Н. Никулина, Н.А. Никулин, А.А. Зимин*

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», РФ, г. Пушкино

*e-mail: firetiger2011@yandex.ru, тел. +79531324523

Бактериофаги имеют ряд способов защиты от УФ-излучения. Первый связан с наличием у некоторых бактериофагов систем репарации, так ряд родов Т4-подобных бактериофагов кодирует собственную ДНК-гликозилазу – DenV. Второй способ связан с особенностями строения капсида фагов. Уязвимость фагов к УФ может быть связана с экологической нишей, например, адсорбция на глинах или нахождение в биопленках сильно повысит уровень выживаемости частиц. Устойчивость может зависеть от характеристик генома бактериофага, таких как его размер, плотность упаковки, состав – ДНК или РНК и особенности оснований, их образующих. В случае ДНК-содержащих бактериофагов, стоит отметить, что разница в устойчивости может наблюдаться как из-за GC-состава, так и из-за наличия неканонических и модифицированных оснований. Не так много данных о том, как именно влияет УФ-излучение на ДНК с неканоническими основаниями и с какой частотой могут образовываться фотоповреждения в ней. Тем не менее в ранних исследованиях было показано, что некоторые бактериофаги с неканоническими основаниями могут быть более устойчивыми к УФ-облучению, чем другие [1-2].

Мы проверили воздействие УФ-излучения на часть коллекции фагов с неканоническими основаниями, ранее выделенными из сточных вод города Пушкино (Pu11, Pu40, Pu13) и сравнили их с бактериофагом Т4 и его цитозиновым мутантом – Т4alc7. Все бактериофаги относятся к одному и тому же подсемейству – *Tevenviriae*, кодируют DenV, мало отличны по морфологии капсида [3]. Существенные различия наблюдались в составе оснований ДНК данных фагов [3]. В результате облучения коротковолновым УФ ($\lambda=254$ нм) произошла инактивация всех бактериофагов за 15 с. Таким образом, доза инактивации для Т4, Т4alc7, Pu11, Pu13, Pu40 может составлять менее 10 Дж/м². За время облучения УФ ($\lambda=366$ нм) в течение 30 минут численность бактериофагов с модифицированными ^{5hm}C уменьшилась в 2-2,5 раза, а численность - Т4

ac17 снизилась в 3,52 раз. Влияния на морфологию бляшек всех бактериофагов, кроме T4alc7, образующихся при длинноволновом облучении замечено не было, также не было замечено изменений в характере зарастания бляшек всех фагов толерантной культурой. Наиболее устойчивым оказался бактериофаг Pu11, его титр упал всего в два раза по сравнению с исходным. Это соотносится с результатами, ранее полученных Дрейком для бактериофага RB69 [2], для которого Pu11 является близкородственным. Pu11 имеет в своем составе 5'-арабинозил-оксиметилцитозин. Вполне вероятно, что именно за счет него, выживаемость Pu 11 немного выше, по сравнению с фагом, не имеющим модифицированные неканонические основания – T4alc7. Таким образом, было экспериментально показано, что бактериофаги с неканоническими основаниями Pu11, Pu40, Pu13 достаточно устойчивы к действию длинноволнового УФ. Данная гипотеза также может быть проверена на трансдуцирующих частицах фагов с модифицированными основаниями, которые будут содержать не фаговую, а плазмидную ДНК в своем составе.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00669, <https://rscf.ru/project/22-25-00669/>

1. Jończyk, E et al. (2011) doi:10.1007/s12223-011-0039-8
2. Smith, L A, and J W Drake. (1998) doi:10.1093/genetics/148.4.1611
3. Nikulin, Nikita A, and Andrei A Zimin. (2021) doi:10.3389/fmicb.2021.632686

**РАЗРАБОТКА МАТЕМАТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ АНАЛИЗА
ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА
РАСТЕНИЙ И ВОДОРΟΣЛЕЙ ПО ДАННЫМ ОПТИЧЕСКИХ ИЗМЕРЕНИЙ ДЛЯ
ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА**

**Development of mathematical models for the analysis of the functional state of the
photosynthetic apparatus of plants and algae based on optical measurements for
environmental monitoring**

*Сергей Хрущев**, Татьяна Плюснина, Галина Ризниченко, Андрей Рубин

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Биологический факультет, Ленинские Горы 1, стр. 12,
Москва 119234, Россия

**e-mail: styx@biophys.msu.ru, +7 495 9391402*

Современные представления о строении и функционировании фотосинтетического аппарата (ФСА) позволяют создавать чрезвычайно сложные математические модели, позволяющие детально воспроизвести наблюдаемые в экспериментах явления и предсказать, как изменение параметров отдельных реакций скажется на процессе в целом. Такие модели позволяют понять биофизические механизмы, лежащие в основе функционирования ФСА. Однако для решения как фундаментальных, так и прикладных задач, связанных с экологическим мониторингом, необходимо решение обратной задачи – на основании экспериментальных данных определить параметры происходящих в ФСА процессов. Детальные математические модели оказываются не слишком эффективными в решении обратной задачи, так как число параметров таких моделей велико, и изменение разных параметров зачастую может приводить к сходным изменениям наблюдаемых в эксперименте сигналов. В этом смысле для решения обратной задачи гораздо удобнее применять упрощенную модель, учитывающую лишь небольшое число ключевых для динамики ФСА процессов. Однако использование изначально простых моделей вызывает вопросы: все ли значимые процессы учитываются? Можно ли отнести константы скорости модели к конкретным процессам?

Нами предложен оригинальный математический подход, позволяющий на основе имеющейся в биологической системе иерархии характерных времен провести редукцию детальной модели для получения такой упрощенной модели, которая будет оптимальной для однозначной идентификации параметров по экспериментальным данным [1]. Применение этого подхода для создания интегральной модели

фотосинтетической электрон-транспортной цепи позволяет существенно уменьшить число уравнений модели. «Медленные» переменные, описывающие динамику редокс-состояния подвижных переносчиков электрона, в интегральной модели рассматриваются как дополнительные параметры, определяющие состояние трансмембранных комплексов – фотосистем I и II, цитохромного b_6/f комплекса, и др. Это позволяет описать функционирование этих комплексов в терминах «функций отклика», характеризующих зависимость квазистационарной скорости потока электронов через комплекс как от параметров элементарных стадий переноса электрона внутри комплекса, так и от параметров пулов мобильных переносчиков. Получаемая в результате интегральная модель описывается небольшим числом комбинированных параметров, численные значения которых могут быть идентифицированы по экспериментальным данным.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 22-11-00009.

1. Plyusnina et al. *Photosyn Res*, 2023, submitted

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ОТВЕТОВ НА УМЕРЕННЫЕ
ЛОКАЛЬНЫЕ СТРЕССОРЫ У РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ, ВЫРАЩЕННЫХ В
ЛАБОРАТОРНЫХ И ЕСТЕСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ**

**Comparison of physiological responses to moderate local stressors in wheat plants
grown in laboratory and natural conditions**

*Л.М. Юдина**, А.Ю. Попова, Е.М. Сухова, Ю.А. Золин, В.С. Сухов

ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский
государственный университет им. Н.И. Лобачевского»
(ННГУ им. Н.И. Лобачевского)

**e-mail: lyubovsurova@mail.ru, тел. +7 915 9571127*

Растениям для приспособления к меняющимся условиям необходимы специальные сигналы, способные вызывать физиологические изменения на уровне целого организма. Одними из наиболее быстрых стрессовых сигналов являются деполяризационные электрические сигналы, которые могут влиять на фотосинтез, дыхание, экспрессию генов, синтез фитогормонов и другие процессы. Однако, возможность распространения таких сигналов и их роль в естественных условиях остается дискуссионным вопросом. Целью работы стало сравнение физиологических ответов растения при действии комбинации локального освещения и нагрева в лабораторных условиях, и условиях, приближенных к естественным.

В качестве объектов использовались 2-3х недельные растения пшеницы, которые выращивались на почвенном субстрате при 24°C и 16-часовом световом дне в лабораторных условиях и в естественных условиях, но с исключением внешнего полива. Для контрольных растений производили систематический полив, для создания почвенной засухи полив прекращался. Для индукции электрических сигналов производилось локальное воздействие на лист растения синим светом и повышенной температурой. Электрических сигналы регистрировали с помощью Ag⁺/AgCl электродов. Изменение параметров фотосинтеза проводилось с использованием РАМ-флуориметра, расчёт индекса проводимости устьиц осуществлялся с помощью тепловизора.

В лабораторных условиях показано, что при действии стрессоров вблизи зоны воздействия возникала деполяризация, на отдалении сменяющаяся гиперполяризацией. Сильная почвенная засуха подавляла такие сигналы. Воздействие приводило к снижению квантового выхода фотосистемы II и к увеличению нефотохимического тушения

флуоресценции. На больших расстояниях от места воздействия ответы фотосинтеза не наблюдались. Распространение сигнала приводило к снижению устьичной проводимости, при этом эффект уменьшался с увеличением расстояния до зоны раздражения.

Анализ особенностей ответов на стрессоры у растений, выращенных в условиях открытого грунта, показал, что могут возникать как деполяризационные, так и гиперполяризационные сигналы. Анализ влияния сигналов на фотосинтез показал, что при поливе гиперполяризационные сигналы вызывали инактивацию фотосинтетических процессов, как и в лабораторных условиях. При умеренной засухе деполяризационные сигналы вызывали инактивацию фотосинтеза, которая наблюдалась на больших расстояниях от зоны воздействия, что было сходно с данными лабораторного эксперимента. Изменения открытости устьиц не были механизмом изменения фотосинтеза, отсутствие соответствия локализации ответов фотосинтеза и транспирации было подобно лабораторному эксперименту. Кроме того, выявлено, что индукция сигналов на 6-7е сутки засухи приводила к меньшему итоговому подавлению продуктивности растений.

Полученные результаты подтверждают возможность возникновения электрических сигналов при действии умеренных стрессоров у растений, выращенных в естественных условиях по сравнению с лабораторными, а также их влияние на фотосинтез и засухоустойчивость.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 21-74-10088.

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА РАСТЕНИЙ ЛИПЫ И БЕРЕЗЫ В ГОРОДСКИХ УСЛОВИЯХ

Chlorophyll fluorescence of linden and birch plants in urban conditions

Ольга Яковлева^{1*}, Дарья Тодоренко¹,
Алексей Глинушкин², Дмитрий Маторин¹

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
г. Москва, Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии,
Московская область, Россия

*e-mail: oolga.yakovleva@gmail.com, тел. +7 905 5065541

Состояние городских насаждений может служить надежным критерием загрязнения среды, так как чувствительность растений ко многим загрязнениям часто значительно выше, чем у человека и животных [1]. Для оценки работы фотосинтетического аппарата и физиологического состояния высших растений в последнее время стали широко использоваться методы измерения индукционных кривых флуоресценции с высоким временным разрешением (от 10 мкс) при возбуждении интенсивным светом. В настоящей работе при одновременном измерении параметров флуоресценции хлорофилла и редокс-состояния хлорофилла P_{700} с использованием многофункционального анализатора растений М-РЕА2 изучены особенности процессов фотосинтеза в листьях деревьев липы (*Tilia cordata* L.) и березы (*Betula verrucosa* L.), растущих вдоль Московской кольцевой автомобильной дороги (МКАД). Было показано, что при переходе древесных растений из активного состояния в летний период в состояние зимнего покоя уменьшается скорость фотосинтетического транспорта электронов в результате блокирования транспорта электронов между фотосистемами ФС1 и ФС2. В летний период у деревьев, произрастающих близ магистралей, выявлено ухудшение электронного транспорта на уровне пластохинонов (δ_{Ro}), снижение скорости восстановления P_{700}^+ и изменение в параметрах замедленной флуоресценции. У этих растений отмечено повышение светочувствительности и замедление реакций восстановления в темноте после прекращения фотоокислительного стресса, что подтверждает вероятное влияние неблагоприятных городских условий на биосинтез белков РЦ ФС2. В качестве индикаторов состояния деревьев в городской



среди предложено использовать следующие параметры флуоресценции: общий индекс производительности (PI_{total}) и параметр δ_{Ro} , а также параметры замедленной флуоресценции.

1. Маторин, Д.Н., Рубин А.Б. Флуоресценция хлорофилла высших растений и водорослей.– Москва–Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2012.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

Абдуллатыпов Азат	57, 102
Аверчева Ольга	51
Айбуш А.В.	36, 40, 46, 184
Аксенова Н.А.	135
Алексеев Алексей	123
Алфёрова В.А.	143
Андреева Т.В.	180
Аникина Надежда	161
Анисина Александра	51
Антал Тарас	264, 269
Антоненко Ю.Н.	155
Астафьев Артём	163
Асташев М.Е.	38, 44
Ашихмин А.А.	28, 34, 53, 57, 262

Б

Баврина А.П.	159
Бакланов Алексей	131
Балалаева И.В.	129, 139, 145
Балашов Н.В.	55, 59, 61, 73
Балашов Сергей	119
Бассарская Елизавета	51
Белашов А.В.	125, 175
Беликов Николай	121
Белоусова И.И.	159
Белько Н.В.	151
Беляева Наталья	26
Беляева О.Б.	114
Беляева Т.Н.	175
Бендикис А.С.	34, 155
Бодунова Дарья	201
Большаков В.А.	108

Большаков Максим	28, 53
Бондаренко Г.Н.	85
Бондарь В.С.	230, 234, 236
Борисова-Мубаракшина М.М.	55, 57, 59, 61, 65, 69, 73, 88
Боровков Андрей	246
Борщевский Валентин	123, 224
Бражникова А.В.	59
Брилкина Анна	145
Буглак Андрей	165, 179
Бугрова Юлия	129
Будылин Глеб	110
Букач Олеся	201
Булычев Александр	26
Буракова Людмила	203, 205, 209, 219
Буров Андрей	232
Буторин П.С.	175
Бухалович Сергей	115
Буханько Антонина	110
Бучарская Алла	167

В

Валиулин Сергей	131
Варфоломеев Сергей	121
Васильченко Данила	127
Васютинский О.С.	125, 169, 175
Васягина Т.И.	159
Ведякин Алексей	169
Верещагин Михаил	53
Верная О.И.	211
Ветошкина Д.В.	55, 57, 61, 69, 73, 75, 94
Викс Татьяна	63
Вильянен Д.В.	57, 61, 65, 88

Витухновская Л.А.	35
Вишневская Анна	30
Воденев В.А.	77, 273
Волгушева Алёна	264, 269
Волков Денис	169
Воронов Дмитрий	279
Воронова Елена	269
Воропай Е.С.	151
Высоцкий Евгений	203, 205, 209, 219, 224
Вышедко А.М.	222

Г

Галимзянов Т.Р.	193
Гвоздев Д.А.	79, 143, 201
Генин Вадим	167
Генина Элина	167
Глаголева Е.С.	85, 87
Глебов Евгений	127
Глинушкин Алексей	287
Гольбек Дж.	42
Горбунова Иоанна	125, 169
Горделий Валентин	115, 123
Горленко Е.С.	171
Горохова Анастасия	129, 145
Гостев Ф.Е.	40, 42, 184
Гречаник В.И.	248
Гривин Вячеслав	127
Грин М.А.	147, 157
Гринберг М.А.	77, 273
Грязнова Ульяна	67
Гудвилевич Ирина	246
Гульнов Дмитрий	207, 209
Гущин И.Ю.	112, 123, 228

Д

Дегтерева Наталья	81
Деменьшин А.И.	173, 195
Демина Ольга	121
Джатдоева Софья	92
Дмитриева Дарья	224
Доманская Ирина	71
Донцов А.Е.	113

Е

Еремеева Елена	209, 219, 224
Ершов Кирилл	131
Есимбекова Елена	215
Ефимова Екатерина	153

Ж

Жданкин Григорий	127
Жигалова Татьяна	51
Житлов М.Ю.	143
Жихорева А.А.	125, 175
Жукова Г.В.	222, 238, 240

З

Забелин Алексей	32
Заднепровская Елена	250
Зайцев Петр	250
Залесский А.Д.	177, 182, 185
Заспа А.А.	35, 40
Захарова Юлия	236
Зимин А.А.	281
Золин Ю.А.	83, 271, 285
Зорин Николай	259
Зыкова Д.Д.	133, 137, 193

И

Иванисенко Владимир	205, 219
Иванисенко Никита	203, 205, 219
Иванов Борис	57, 65, 69, 73, 75
Иванова А.В.	273
Иванова Дарья	279
Иванская Е.В.	171
Игнатова Людмила	69, 75
Изосимова Анна	199
Ильинский Николай	123
Истомина М.С.	173
Ишемгулов Азамат	141

К

Кабашникова Людмила	63, 71
Каменчук Виктория	92
Каминская С.С.	211
Кардумян В.В.	135
Карташов А.В.	250
Киор Анастасия	271
Киреева Инга	102
Кичеева Арина	213, 244
Клаус А.А.	254
Ковалев Вячеслав	32
Ковалев К.В.	112, 123
Ковалева Маргарита	224
Козлов А.С.	155
Козлова Т.А.	250
Козобкова Н.В.	151
Козулева М.А.	57, 61, 65, 69, 88, 254
Кокоренко Андрей	127
Коленчукова О.А.	222, 238, 240
Колосова Елизавета	242
Кононов Алексей	165, 179

Константинова А.Н.	133, 137
Конюхов Иван	264, 269, 275
Коппель Л.А.	114, 277
Корватовский Б.	79
Корнилова Е.С.	175
Корченева Мария	153
Коршун В.А.	143
Корягин Андрей	161
Кособрюхов Анатолий	53
Котова Е.А.	155
Кочетова Галина	51
Кочаров Азрет	92
Кочубей Сергей	131
Крапивина Анастасия	250
Красильников М.С.	143
Краснова Елена	277, 279
Красновский А.А.	34, 155
Кратасюк В.А.	215, 222, 226, 238, 240, 242
Креславский Владимир	53
Крицкий М.С.	36, 46
Крылова Л.В.	139
Крюкова Е.А.	108
Кубенко Варвара	179
Кудряшева Н.С.	213, 217, 242, 244
Кузнецов В.В.	254
Кузнецова Дарья	77
Кузьмин Александр	123
Кузьмина Н.С.	139
Курьянова А.С.	135

Л

Лабунская Елена	279
Лапшин Р.Д.	159
Ларионова Марина	219
Ле Виолетта	236

Лелеков Александр	252
Летута Сергей	141
Лисица Альберт	226
Лобакова Е.С.	85, 87
Лобышев Валентин	279
Ломакина Г.Ю.	211, 221
Луговский А.П.	151
Лукашев Е.П.	79, 108, 119
Лукин Алексей	121
Лысенко Е.А.	254

М

Максимов Евгений	110, 201
Малеева Ю.В.	36, 46, 117
Мальшева В.В.	222
Малюченко Н.В.	180
Мамедов М.Д.	35, 79, 119
Мариевская К.А.	143
Мария Моисеева	259
Маркин Роман	61, 73, 102
Мартиросян Давид	182, 185
Маслякова Галина	167
Маторин Дмитрий	287
Медведева Светлана	232
Мельников Алексей	127
Милановский Г.Е.	30, 36, 40, 46
Михайлов Анатолий	115
Михновец И.Э.	143
Мишин Алексей	224
Могильная Ольга	234, 236
Можеров Артем	199
Молчан Ольга	71
Морозова Н.Б.	147
Москаленко А.А.	34
Мудрак Дмитрий	167

Н

Наволокин Никита	167
Надеева Елена	69, 75
Надточенко В.А.	36, 42, 46, 163, 177, 182, 184, 185
Найдов И.А.	57, 59, 61, 65, 69
Наташин Павел	205, 219, 224
Неверов К.В.	36, 46, 117
Немцева Елена	207, 209, 226
Немцова Ю.А.	77, 273
Никитин Т.Д.	143
Никифоров Андрей	169
Николаев А.С.	228
Никулин Н.А.	281
Никулина А.Н.	281
Новопашина Д.С.	171
Нокс П.	79
Нючев А.В.	139

О

Обухов Ю.Н.	36, 46, 117
Островский М.А.	113
Осыченко А.А.	177, 182, 185
Отвагин В.Ф.	139

П

Павлов Игорь	232
Павлова М.А.	147
Панкратов А.А.	147
Панченко П.А.	147
Пасхин М.О.	28, 38, 44
Пашковский Павел	53
Пашенко В.	79
Пескова Н.Н.	129, 139, 145
Петрова А.А.	40, 46
Петрова Юлия	242

Петровская Л.Е.	108, 119, 121
Петушков Валентин	207, 209
Петушкова Екатерина	259
Пищальников Р.Ю.	187
Плюснина Татьяна	81, 264, 269, 283
Плотинская А.Д.	147
Поволоцкий А.В.	191
Погосян Сергей	275
Поздеева Л.Е.	133
Поздняков Иван	127
Помогаев Владимир	179
Попова А.Ю.	83, 271, 285
Посохина Е.Д.	230, 232, 234, 236
Притымов Д.А.	147
Прокопьев В.Е.	149
Птушенко В.В.	85, 87
Птушенко О.С.	85, 87
Пузырь Алексей	232
Пшибытко Н.Л.	254
Пыряева Александра	131
Пыхова Е.С.	57, 88

Р

Ратницына Дарья	90, 98
Ремеева А.А.	112
Ризниченко Галина	26, 81, 283
Рогачев Андрей	123
Родионова Наталья	207
Рожко Т.В.	217
Рокицкая Т.И.	155
Ронжин Никита	234, 236
Рубин Андрей	26, 81, 110, 283
Руденко Наталья	61, 69, 75, 100, 102
Румянцев Борис	92
Рыжих Ю.С.	94

С

Савицкий А.П.	151
Савченко Татьяна	67
Саковина Л.В.	171
Салова А.В.	175
Самцов М.П.	151
Сасин Максим	125, 169
Сафин Роман	131
Сафинова Александра	121
Сачкова Анна	244
Сачкова Дарья	199
Свинко В.О.	189, 195
Сейфуллина Н.	79
Семенов А.Ю.	30, 35, 40, 42, 184
Семенов О.Ю.	112
Семенова И.В.	125, 175
Сенчукова Марина	141
Сердюк Ольга	259
Серов Д.А.	38, 44
Сидоров Даниил	115
Силецкий С.А.	108, 119, 123
Синещёков В.А.	114
Слонимский Юрий	110
Случанко Николай	110
Смирнов А.А.	191, 195
Смирнов А.Н.	195
Смирнов Василий	161
Смирнова Ольга	161
Соколов В.С.	133, 137, 193
Соловченко А.Е.	85, 87, 250, 256
Соловьёва А.Б.	135
Соловьёва Е.В.	173, 189, 191, 195, 197
Стародубов Александр	28, 259
Старыгина Полина	257, 262
Степанова Л.В.	222, 238, 240
Степин Евсей	244
Страховская М.	79

Студитский В.М.	180
Суковатый Лев	226
Суковатых П.Р.	137
Сулейманов Евгений	161
Сутормин Олег	242
Сухих Андрей	236
Сухов В.С.	83, 90, 96, 98, 271, 285
Сухова Е.М.	83, 90, 96, 98, 271, 285
Сушко Екатерина	213, 244
Сырчина Мария	163
Сыч Томаш	165

Т

Таисова Александра	50
Тарасов Д.С.	151
Ташкин В.Ю.	193
Терентьев В.В.	94, 100, 106
Тимофеев Антон	232
Тодоренко Дарья	269, 287
Торгашина Ирина	242
Точило У.А.	182, 185
Трубицин Б.В.	85
Трубицин Иван	100, 102
Трубицина Любовь	100, 102
Тучин Валерий	167
Тучина Елена	153
Тцховребов Александр	163

У

Угарова Н.Н.	221
Уродкова Е.К.	133, 137
Устинов А.В.	143

Ф

Федоров А.Ю.	139
Фёдорова О.А.	147
Федотов Ю.А.	177
Феофанов А.В.	180
Фетисова Зоя	50
Фирсов А.М.	155

Х

Харитоновна Ю.В.	193
Хасимов Махмадюсуф	259
Хатыпов Равиль	32
Хлебцов Борис	167
Хлебцов Николай	167
Ходонов Андрей	121
Хорошаева Татьяна	69, 102
Христин Антон	32
Хрущев Сергей	81, 264, 269, 283
Худякова Александра	53

Ц

Цорасев Георгий	110
Цыбров Федор	123
Цыганков А.А.	248, 257, 259, 261, 262

Ч

Черепанов Д.А.	36, 40, 42, 46, 110, 184
Черникова П.	180
Чивкунова Ольга	250
Чижов Игорь	123
Чистов А.А.	143

Чичерина Галина	131
Чудакова Ольга	257, 262
Чумаков Степан П.	143
Чуракова Светлана	48

Ш

Шакина Ярослава	110
Шарабарина Татьяна	153
Шахов Александр	163
Шевцов Михаил	224
Шевченко Виталий	123
Шевчук А.И.	195, 197
Шелавев И.В.	40, 42, 184
Шибзухова К.А.	85, 87
Шилягина Наталья	145
Ширманова Марина	199
Ширшин Евгений	110
Шитов Александр	104
Шишкин Андрей	161
Шкуропатов Анатолий	32
Шлеева М.О.	151
Шукшина Анна	100, 106
Шумилкин А.С.	211

Щ

Щелчкова Н.А.	159
Щеславский Владислав	199

Ю

Юденко А.Н.	228
Юдина Л.М.	83, 271, 285
Южакова Диана	199

Я

Яковлев Андрей	50
Яковлева М.А.	113
Яковлева Ольга	287
Яныкин Д.В.	28, 38, 44
Яшин Константин	199
Яшков Дмитрий	169

В

Bolle C.	114
Bulatkin Gennady	266

С

Casazza Anna Paola	40
--------------------	----

S

Santabarbara Stefano	40
----------------------	----

СПОНСОРЫ И ПАРТНЕРЫ

ООО «ЛАБИНСТРУМЕНТЫ»

специализируется на
оборудовании для изучения
растений и среды их обитания, а
также для выращивания растений.



В том числе: физиология растений, фотосинтез, ботаника, биотехнологии, теплицы, агротехника, фенотипирование, селекция, мониторинг параметров окружающей среды.

Компания ЛАБИНСТРУМЕНТЫ работает со всеми ведущими производителями оборудования для изучения растений:

Apogee Instruments	www.apogeeinstruments.com
CID Bio-Science	www.cid-inc.com
Dynamax	www.dynamax.com
Felix Instruments	www.felixinstruments.com
FT Green LLC	www.atleaf.com
Hansatech Instruments	www.hansatech-instruments.com
Heinz Walz GmbH	www.walz.com
LI-COR Biosciences	www.licor.com
Photon Systems Instruments	www.psi.cz
Plant Moisture Stress Instr.	www.pmsinstrument.com
PP Systems	www.ppsystems.com
Qubit Systems	www.qubitsystems.com
Regent Instruments	www.regentinstruments.com
Stevens Water	www.stevenswater.com

и многими другими!

В нашем ассортименте:

- √ Системы измерения газообмена растений и почв
- √ Флуориметры для измерения флуоресценции хлорофилла для работы с листьями и суспензиями
- √ Анализаторы площади листьев и листового индекса
- √ Анализаторы морфологических параметров растений
- √ Анализаторы устьичной проводимости, вегетационных индексов, уровня содержания хлорофилла и другие
- √ Приборы для измерения респирации кислорода
- √ Оборудование для выращивания и культивирования растений
- √ Станции фенотипирования и сканеры для них
- √ Приборы для измерения водного стресса растений
- √ Приборы для анализа качества плодов
- √ Датчики освещенности, температуры, влажности, pH и др.
- √ и многое другое!

ООО «ЛАБИНСТРУМЕНТЫ»

119571, г. Москва, ул. ак. Анохина, д. 64А
Тел. +7(499)213-2652 (доб 901), +7(903)762-0296
sa@labinstruments.ru www.labinstruments.ru



ООО «Феномика»

Компания Феномика предлагает широкий спектр профессиональных решений и услуг на основе спектральных технологий по направлениям фенотипирование растений, медицина и криминалистика, наука.

Московская обл., г.о. Красногорск, Архангельское п., д. 2Б,
стр. 4, оф. 5

+7 (495) 229-44-63

info@phenomics.ru

www.phenomics.ru



ФОНД
РАЗВИТИЕ
ХИМИЧЕСКОЙ
ФИЗИКИ



Российское фотобиологическое общество
Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии
наук – обособленное подразделения Федерального государственного
бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических исследований Российской
академии наук»
Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

Научное издание

Х СЪЕЗД РОССИЙСКОГО ФОТОБИОЛОГИЧЕСКОГО ОБЩЕСТВА
КОНФЕРЕНЦИЯ «СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ФОТОБИОЛОГИИ»
пос. Шепси Краснодарского края
10 – 17 сентября 2023 г.

Материалы конференции

Материалы изданы в авторской редакции

Подписано в печать 27.08.2023. Формат 60x84/16
Усл. печ. л. 17,44

ISBN 978-5-6050635-0-6



ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2023