



**IX Съезд
Российского фотобиологического общества
Всероссийская конференция
“Современные проблемы фотобиологии”
пос. Шепси, 12–19 сентября 2021 г.**

Материалы съезда

Пушино 2021

Российское фотобиологическое общество
Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии
наук – обособленное подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН
Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

**IX Съезд
Российского фотобиологического общества
Всероссийская конференция
“Современные проблемы фотобиологии”**

пос. Шепси, 12–19 сентября 2021 г.

Материалы съезда

Пушино – 2021

IX Съезд Российского фотобиологического общества.**Материалы съезда.**

ред. И. А. Найдов.

г. Пущино, Россия 2021, 182 стр.

ISBN 978-5-9905822-4-8

ОБРАЩЕНИЕ К УЧАСТНИКАМ

Глубокоуважаемые коллеги!

Дорогие друзья!

Я рад приветствовать вас на IX съезде Российского фотобиологического общества, который проводится в пансионате «Маяк», пос. Шепси Краснодарского края. Наша встреча проходит в непростой обстановке, и глубокая благодарность тем, кто смог принять в ней участие, лично или дистанционно. В рамках съезда проводится также всероссийская конференция «Современные проблемы фотобиологии». Съезд и конференция проводятся при поддержке Института фундаментальных проблем биологии Российской академии наук - обособленного подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН и Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова». Программа съезда и конференции включает следующие секции:

1. Первичные процессы фотосинтеза (организаторы: Проскуряков И. И., Семёнов А. Ю.)
2. Регуляция фотосинтеза (организаторы: Войцеховская О. В., Иванов Б. Н., Козулева М. А.)
3. Фоторецепция (организаторы: Коппель Л. А., Петровская Л. Е.)
4. Фундаментальные основы фотодинамической, лазерной и PUVA терапии (организаторы: Грин М. А., Красновский А. А., Миронов А. Ф.)
5. Биопhotоника молекул и наночастиц (организаторы: Надточенко В. А., Тучин В. В.)
6. Биолюминесценция и фотоника флуоресцентных белков (организаторы: Высоцкий Е. С., Исмаилов А. Д., Кратасюк В. А.)
7. Микроводоросли как преобразователи солнечной энергии в биотоплива и ценные продукты (организаторы: Соловченко А. Е., Цыганков А. А.)
8. Экологическая фотобиология (организаторы: Кокшарова О. А., Погосян С. И.)

На нашей встрече предстоит заслушать 90 устных и рассмотреть 65 стендовых научных докладов, а также заслушать отчет о работе общества за прошедший период и выбрать новый состав ЦС.

На съезде и конференции будет проводиться конкурс лучших работ молодых ученых.

Я приветствую вас и надеюсь, что научные дискуссии окажутся плодотворными, молодые ученые представят конкурентные работы высокого уровня, мы выберем новый Центральный совет, а главное – укрепятся прежние научные связи разных организаций и появятся новые.

Президент Российского фотобиологического общества,
А. А. Цыганков

ОРГАНИЗАТОРЫ

Программный комитет

Председатель: Семёнов Алексей Юрьевич – НИИФХБ МГУ, Москва
 Войцеховская О.В. – БИН РАН им. В.Л. Комарова, Санкт-Петербург
 Высоцкий Е.С. – Институт биофизики СО РАН, Красноярск
 Грин М.А. – МИРЭА-Российский технологический университет, Москва
 Иванов Б.Н. – ИФПБ РАН, Пушкино
 Исмаилов А.Д. – МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва
 Козулева М.А. – ИФПБ РАН, Пушкино
 Кокшарова О.А. – НИИФХБ МГУ, Москва
 Коппель Л.А. – МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва
 Котова Е. А. – НИИФХБ МГУ, Москва
 Кратасюк В.А. – СФУ, Институт биофизики СО РАН, Красноярск
 Миронов А.Ф. – МИРЭА-РТУ, Москва
 Надточенко В.А. – ИХФ им. Н.Н. Семенова, Москва
 Петровская Л.Е. – ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
 Погосян С.И. – МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва
 Проскураков И.И. – ИФПБ РАН, Пушкино
 Соловченко А.Е. – МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва
 Тучин В.В. – СГУ им. Н.Г. Чернышевского, Саратов
 Тютерева Е.В. – БИН РАН им. В.Л. Комарова, Санкт-Петербург

Организационный комитет

Председатель: Цыганков Анатолий Анатольевич – Институт фундаментальных проблем биологии РАН (ИФПБ РАН), Пушкино

Заместители председателя оргкомитета:

Котова Елена Аврамовна – НИИФХБ МГУ, Москва
Мамедов Махир Джафарович – НИИФХБ МГУ, Москва

Ученый секретарь:

Коппель Лариса Алексеевна – МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Ветошкина Дарья Васильевна – ИФПБ РАН, Пушкино
 Красновский Александр Александрович – Институт биохимии им. А. Н. Баха, Москва
 Проскураков Иван Игоревич – ИФПБ РАН, Пушкино
 Соловченко Алексей Евгеньевич – МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва
 Стерелюхина Ирина Геннадьевна – ИФПБ, Пушкино
 Коровина Елена Сергеевна – ИФПБ РАН, Пушкино
 Федорчук Татьяна Петровна – ИФПБ РАН, Пушкино

ПРОГРАММА КОНФЕРЕНЦИИ

13 СЕНТЯБРЯ, ПОНЕДЕЛЬНИК

8:30–9:00. Регистрация

9:00–9:15. Открытие Съезда и конференции «Актуальные проблемы фотобиологии»

СЕКЦИЯ «РЕГУЛЯЦИЯ ФОТОСИНТЕЗА»

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: М.А. Козулева, А.В. Богачев

9:15–9:45. **Ольга Войцеховская**, Роль хлорофилла *b* в ретроградном сигналинге

9:45–10:15. **Мария Борисова-Мубаракшина**, Механизм участия пула пластохинона хлоропластов в ретроградной сигнализации в фотосинтезирующих клетках высших растений

10:15–10:45. **Галина Ризниченко**, Молекулярные, броуновские, кинетические модели и Монте Карло модели процессов в фотосинтетической мембране высших растений и микроводорослей

10:45–11:15. **Владимир Сухов**, Вызванные локальным действием абиотических стрессоров системные фотосинтетические ответы растений: механизмы и дистанционный мониторинг

11:15–11:40 КОФЕ-БРЕЙК

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: О.В. Войцеховская, В.С. Сухов

11:40–12:00. **Александр Богачев**, Na⁺-транслоцирующая ферредоксин:NAD⁺-оксидоредуктаза является компонентом фотосинтетической электрон-транспортной цепи зеленых серных бактерий

12:00–12:20. **Илья Захожий**, Функциональная активность фотосинтетического аппарата *Hylotelephium triphyllum* в период индукции САМ и ее регуляция в природных условиях

12:20–12:40. **Екатерина Петушкова**, Пути восполнения пула интермедиатов ЦТК у фотосинтезирующих пурпурных несерных бактерий

12:40–13:00. **Татьяна Савченко**, Организация и функционирование кортикулярного фотосинтетического аппарата (online)

13:00–15:00. ОБЕД, РАЗМЕЩЕНИЕ СТЕНДОВ

Устные доклады

Председатели заседания: М.М. Борисова-Мубаракшина, В.В. Терентьев

15:00–15:20. **Александра Муртузова**, Влияние уровня активности основного модулятора стрессовых ответов растений – SnRK1-киназы – на фотосинтез *Arabidopsis thaliana*

15:20–15:40. **Людмила Кабашникова**, Фотосинтетическая активность хлоропластов на разных стадиях биогенеза в проростках ярового ячменя при гельминтоспориозе

15:40–16:00. **Наталья Руденко**, Карбоангидразы в фотосинтезирующих клетках *Arabidopsis thaliana*

16:00–16:20. **Дарья Ветошкина**, Изменение размера светособирающей антенны ФС2 – универсальный механизм адаптации фотосинтетического аппарата высших растений

16:20–16:40. **Оксана Птушенко**, Роль разных механизмов регуляции светосбора в защите от светового стресса у растений рода *Tradescantia*

16:40–17:00. **Екатерина Сухова**, Использование индексов отражения в видимом диапазоне света для оценки и прогнозирования изменения активности фотосинтеза высших растений при действии стрессоров (online)

17:00–17:15. КОФЕ-БРЕЙК

Устные доклады

Председатели заседания: Л.Ф. Кабашникова, И.Г. Захожий

17:15–17:35. **Марина Козулева**, Исследование фотосинтетического переноса электронов в цитохромном b_6/f -комплексе с помощью ингибитора окисления пластохинола 2,4-динитрофенилового эфира 2-йодо-4-нитротимола

17:35–17:55. **Валерия Дмитриева**, Регуляция фотосинтеза через симпластный транспорт: cross-talk между хлоропластами и плазмодесмами

17:55–18:15. **Василий Терентьев**, Участие люменальной карбоангидразы САН3 в сохранении высокой активности фотосистемы 2 в *Chlamydomonas reinhardtii*

18:15–18:35. **Ольга Аверчева**, Особенности формирования электрохимического градиента протонов на тилакоидной мембране у проростков ячменя, выращенных на свету различного спектрального состава

18:35–18:55. **Елена Надеева-Журикова**, Участие альфа-карбоангидразы 2 в регуляции подкисления люмена тилакоидов *Arabidopsis thaliana* при освещении

14 СЕНТЯБРЯ, ВТОРНИК

Пленарные доклады

Председатели заседания: А.А. Цыганков, Л.Е. Петровская

9:00–9:35. **Евгений Максимов**, Дизайн гибридных фотоуправляемых конструкций (online)

9:35–10:10. **Алексей Соловченко**, Взаимосвязь липидного метаболизма с фотопротекторными функциями у микроводорослей

СЕКЦИЯ «МИКРОВОДОРОСЛИ КАК ПРЕОБРАЗОВАТЕЛИ СОЛНЕЧНОЙ
ЭНЕРГИИ В БИОТОПЛИВА И ЦЕННЫЕ ПРОДУКТЫ»

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: О.В. Войцеховская, Т.А. Козлова

10:10–10:30. **Дарья Жарова**, Роль автофагии в стрессоустойчивости и активации биосинтеза астаксантина у микроводоросли *Haematococcus pluvialis*

10:30–10:50. **Анастасия Романова**, Преобразование энергии света в водород фотосинтезирующими микроорганизмами и оценка эффективности процесса

10:50–11:10. **Татьяна Козлова**, Физиологическое воздействие фитогормонов и стероидов рыб на показатели роста, биосинтеза и накопления вторичных метаболитов зеленых водорослей: транскрипционный анализ метаболизма липидов и многофакторный статистический анализ индукции

11:10–11:40. КОФЕ-БРЕЙК

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: А.Е. Соловченко, М.В. Синетова

11:40–12:00. **Анатолий Цыганков**, Реакция микроводорослей на недостаток минерального питания при аноксии

12:00–12:20. **Василий Птушенко**, Акклимация фотосинтетического аппарата микроводоросли *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047 к низкой температуре

12:20–12:40. **Александр Лелеков**, Фундаментальные принципы моделирования фотобиосинтеза микроводорослей в культуре

12:40–13:00. **Юлия Вечтомова**, Каротиноид-белковые комплексы из тилакоидных мембран цианобактерии *Arthrospira platensis*

13:00–15:00. ОБЕД, ЗНАКОМСТВО СО СТЕНДАМИ

СЕКЦИЯ «ФОТОРЕЦЕПЦИЯ»

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: Л.А. Коппель, К.В. Неверов

15:00–15:20. **Лада Петровская**, Особенности протонного транспорта в молекуле протейородопсина *Exiguobacterium sibiricum*

15:20–15:40. **Юлия Берцова**, Аминокислотные остатки, определяющие Na^+/H^+ -специфичность Na^+ -транслоцирующего родопсина

15:40–16:00. **Марина Яковлева**, Сравнительное исследование фототоксических свойств окисленных и неокисленных бисретиноидов в липофусциновых гранулах, содержащихся в клетках ретинального пигментного эпителия глаза человека (online)

16:00–16:20. **Гариф Акчурин**, Лазерный RGB метод определения ретинальной остроты зрения человека и спектральной чувствительности колбочек в фовеальной области сетчатки

16:20–16:40. **Лариса Коппель**, Неспецифический ингибитор протеинфосфатаз NaF стимулирует темновую деструкцию фитохрома A в его лабильной форме phyA' в этиолированных корнях кукурузы

16:40–17:00. **Константин Неверов**, Фотохимическая активность димера хлорофилла в белках семейства WSCP: окисление доноров электрона

17:00–17:15. КОФЕ БРЕЙК

17:15–19:00. СЪЕЗД РФО (ОТЧЕТ ПРЕЗИДЕНТА, ВЫБОРЫ НОВОГО ПРЕЗИДЕНТА И СОСТАВА ЦС)

15 СЕНТЯБРЯ, СРЕДА

СЕКЦИЯ «ПЕРВИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ ФОТОСИНТЕЗА»

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

 Председатели заседания: И.И. Проскуряков

9:00–9:40. **Андрей Рубин**, Первичные процессы фотосинтеза и современные проблемы фотобиологии (online)

9:40–10:10. **Людмила Васильева**, Участие белка в тонкой подстройке редокс-потенциала первичного донора электрона в реакционных центрах пурпурных бактерий

10:10–10:40. **Махир Мамедов**, Генерация светозависимой разности электрических потенциалов пигмент-белковыми комплексами фотосистем 1 и 2, адсорбированными на Миллипоровом фильтре, в ответ на стационарное освещение

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

 Председатели заседания: Л.Г. Васильева

10:40–11:00. **Александр Ашихмин**, Фотоиндуцированное образование синглетного кислорода у пурпурных фотосинтезирующих бактерий

11:00–11:20. **Максим Большаков**, Особенности сборки светособирающих комплексов LH2 при ингибировании биосинтеза каротиноидов у серных фотосинтезирующих бактерий

11:20–11:40. КОФЕ-БРЕЙК

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

 Председатели заседания: М.Д. Мамедов, А.А. Ашихмин

11:40–12:00. **Алексей Семенов**, Влияние относительной влажности трегалозной стекловидной матрицы на перенос электрона в комплексах Фотосистемы 2 (online)

12:00–12:20. **Анастасия Петрова**, Механизмы молекулярной адаптации фотосинтезирующих организмов к экстремальным условиям освещенности на уровне фотосистемы 1

12:20–12:40. **Роман Пищальников**, Моделирование переноса энергии возбуждения между бактериохлорофиллом и каротиноидами в светособирающих комплексах пурпурных бактерий

12:40–13:00. **Константин Чеканов**, Нефотохимическое тушение возбужденных состояний хлорофилла у зеленой водоросли *Haematococcus lacustris*

13:00–15:00. ОБЕД, ЗНАКОМСТВО СО СТЕНДАМИ

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

 Председатели заседания: Р.Ю. Пищальников

15:00–15:30. **Виктор Надточенко**, Влияние точечных мутаций вблизи P700 на первичные реакции разделения зарядов и переноса электрона в фотосистеме 1 (online)

15:30–16:00. **Дмитрий Черепанов**, Участие длинноволновых форм хлорофиллов *d* и *f* в первичных реакциях переноса энергии и разделения зарядов в фотосистеме 1 цианобактерий (online)

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

 Председатели заседания: Г.Ю. Ризниченко

16:00–16:20. **Иван Проскуряков**, Спиновые эффекты на первичных стадиях преобразования энергии света

16:20–16:40. **Наталья Беляева**, Анализ кинетики флуоресценции *in vivo* для моделирования потоков электронов в тилакоидных мембранах водоросли *Scenedesmus obliquus* (online)

16:40–17:00. КОФЕ БРЕЙК

17:00–19:00. СТЕНДОВАЯ СЕССИЯ (ПРЕДСТАВЛЕНИЕ СТЕНДОВ ONLINE, ЗНАКОМСТВО СО СТЕНДАМИ)

16 СЕНТЯБРЯ, ЧЕТВЕРГ

СЕКЦИИ «Фундаментальные основы фотодинамической, лазерной и PUVA ТЕРАПИИ» и «Биофотоника молекул и наночастиц»

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: В.Ю. Плавский

9:00–9:35. **Михаил Грин**, Природные хлорины как перспективная платформа для создания препаратов с фотоиндуцированной противоопухолевой и антимикробной активностью

9:35–10:10. **Александр Красновский**, Лазерная активация растворенного кислорода в естественных условиях (online)

10:10–10:45. **Елена Филоненко**, Фотодинамическая терапия в лечении демодекоза кожи лица с местным применением геля на основе 5-АЛК (online)

10:45–11:20. **Виктор Надточенко**, Фемтосекундная спектроскопия в исследовании первичных процессов фотосинтеза (online)

11:20–11:40. КОФЕ-БРЕЙК

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: М.А. Грин, Д.А. Гвоздев

11:40–12:00. **Андрей Миронов**, Конъюгаты соединений порфиринового ряда с производными терпидина как перспективная платформа для создания тераностиков широкого спектра действия (online)

12:00–12:20. **Иоанна Горбунова**, Фотоиндуцированная анизотропная безызлучательная релаксация молекул NADH в растворах различной вязкости и полярности

12:20–12:40. **Виталий Плавский**, Фотоакцепторы и фотохимические механизмы, определяющие регуляторное действие оптического излучения видимой области спектра на клетки эукариот, прокариот и сперматозоиды

12:40–13:00. **Полина Бикмулина**, Фотобиомодуляция метаболизма мезенхимальных стромальных клеток в трехмерных тканеинженерных конструктах

13:00–15:00. ОБЕД, ЗНАКОМСТВО СО СТЕНДАМИ

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: П.Ю. Бикмулина, И.А. Горбунова

15:00–15:20. **Даниил Гвоздев**, Фундаментальные принципы создания фотосенсибилизаторов третьего поколения на основе люминесцентных наночастиц

15:20–15:40. **Александр Фирсов**, Ингибирование фотосенсибилизированного повреждения липосом в присутствии дейтерированных полиненасыщенных жирных кислот

15:40–16:00. **Вадим Генин**, Оптические свойства тканей холангиокарциномы в спектральном диапазоне 350–2000 нм при плазмонной фототермической терапии

16:00–16:20. **Светлана Панкова**, Действие УФ-излучения на свободные и иммобилизованные образцы папаина, фицина и бромелина

16:20–16:40. **Ирина Семенова**, Цифровая голографическая микроскопия и томография как эффективный метод исследования реакции клеток на фотодинамическое воздействие

16:40–17:00. **Наталья Шиягина**, Исследование серии порфиразиновых металлокомплексов со свойствами фотосенсибилизаторов и сенсоров локальной вязкости для решения задач персонализированной фотодинамической терапии

17:00–17:15. КОФЕ БРЕЙК

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

 Председатели заседания: А.М. Фирсов, С.М. Панкова

17:15–17:35. **Анна Жихорева**, Исследование процессов генерации синглетного кислорода и фотовыцветания фотосенсибилизатора Радахлорин на разных биологических поверхностях

17:35–17:55. **Владимир Прокопьев**, Спектры фотобиологической инактивации коронавируса SARS-COV-2 солнечным излучением УФБ-диапазона (280–320 нм)

17:55–18:10. **Владимир Борзиков**, Влияние низкоинтенсивного красного света на постаритмическое изменение микроциркуляции крови крыс

18:10–18:25. **Анна Баврина**, Эффекты модуляции электрических характеристик сердца крыс низкоинтенсивным красным светом в условиях адреналиновой аритмии

18:25–18:45. **Валерий Соколов**, Асимметричное тушение синглетного кислорода в бислойных липидных мембранах молекулами стироловых красителей (online)

18:45–19:00. **Лариса Клапшина**, Метаболические и иммуногенные механизмы усиления терапевтического эффекта при использовании цианоарилпорфиразинов в качестве фотосенсибилизаторов ФДТ

17 СЕНТЯБРЯ, ПЯТНИЦА

СЕКЦИЯ «БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ И ФОТОНИКА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ»

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

 Председатели заседания: Е.С. Высоцкий, Н.С. Кудряшева

9:00–9:35. **Евгений Высоцкий**, Структурные исследования целентеразин-зависимых биоломинесцентных белков

9:35–10:10. **Светлана Маркова**, Люцифераза копепод *Metridia longa*: структура и перспективы улучшения репортерной функции

10:10–10:45. **Надежда Кудряшева**, Радиопротенторные свойства гуминовых веществ. Мониторинг с помощью биоломинесцентных тестовых систем

10:45–11:20. **Галина Ломакина**, Биоломинесцентная тест-система на основе люциферазы светляков и ее использование для изучения внешних воздействий на живые клетки

11:20–11:40. КОФЕ-БРЕЙК

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

 Председатели заседания: С.В. Маркова, Е.В. Немцева

11:40–12:00. **Людмила Буракова**, Варианты взаимодействия концевых аминокислотных остатков в Ca²⁺-регулируемых фотопротеинах на примере обелина и беровина.

12:00–13:00. ПРЕЗЕНТАЦИЯ ГЛАВНОГО СПОНСОРА С ДЕМОНСТРАЦИЕЙ ОБОРУДОВАНИЯ

13:00–15:00. ОБЕД, ЗНАКОМСТВО СО СТЕНДАМИ

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

 Председатели заседания: Г.Ю. Ломакина, Е.В. Еремеева

15:00–15:20. **Елена Еремеева**, Кальций-регулируемые фотопротеины, активированные различными аналогами целентеразина

15:20–15:40. **Константин Пуртов**, Биоломинесцентная система морской полихеты *Chaetopterus variopedatus*

15:40–16:00. **Александр Кудрявцев**, Биоломинесцентный микроанализ ВКЭ в природных клещах

16:00–16:20. **Марина Ларионова**, Гибридные белки на основе люциферазы *Metridia* как сенсоры для биоломинесцентного иммуноанализа

16:20–16:40. **Павел Наташин**, Влияние водородных связей, формируемых N1-атомом 2-гидропероксицелентеразина с аминокислотами активного центра белка, на биоломинесцентные свойства Ca²⁺-регулируемых фотопротеинов морских кишечнорастных

16:40–17:00. **Наталья Маликова**, БиOLUMИнесцентные свойства обелина и акворина с заменой His, Phe (Tyr) и Trp около 6-(п-гидрокси) фенильной группы субстрата

17:00–17:15. КОФЕ БРЕЙК

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: Н.С. Кудряшева, С.В. Маркова

17:15–17:35. **Елена Немцева**, Стадийность разворачивания мочевиной бактериальных люцифераз двух типов

17:35–19:00. ЗНАКОМСТВО СО СТЕНДАМИ

18 СЕНТЯБРЯ, СУББОТА

СЕКЦИЯ «ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ФОТОБИОЛОГИЯ»

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: С.С. Хрущёв, М.А. Гринберг

9:00–9:35. **Сергей Погосян**, Биофизические методы в экологическом мониторинге (online)

9:35–10:10. **Тарас Антал**, Новые технические и программные решения для комплексной оценки параметров фотосинтеза микроводорослей в биотехнологии и экологическом мониторинге

10:10–10:45. **Екатерина Сенатская**, Цианобактерии, образующие длинноволновые пигменты: результаты расширенных поисков

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: Г.Ю. Ризниченко, Е.В. Сенатская

10:45–11:05. **Сергей Хрущёв**, Анализ динамики ответа фотосинтетического аппарата на действие стрессоров по данным индукции флуоресценции хлорофилла *a*

11:05–11:25. **Татьяна Кулешова**, Динамика поглощения света листьями растений в условиях вариации спектральных характеристик световой среды (online)

11:25–11:40. КОФЕ БРЕЙК

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели заседания: Г.Ю. Ризниченко, Е.В. Сенатская

11:40–12:00. **Любовь Юдина**, Оценка фотохимического индекса отражения растений при тепловом стрессе и почвенной засухе

12:00–12:20. **Марина Гринберг**, Влияние хронического облучения на активность фотосинтеза проростков пшеницы в покое и при стрессе

12:20–12:40. **Татьяна Плюснина**, Динамика гетерогенности фотосистемы II в процессе минерального голодания

12:40–13:00. **Ольга Кокшарова**, Регуляторное влияние метаболитов бактерий на процесс фотосинтеза в клетках микроводорослей (online)

13:00–15:00. ОБЕД, ЗНАКОМСТВО СО СТЕНДАМИ

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

15:00–15:20. **Александра Карманова**, Вирусные гликозилазы приримидиновых димеров: эволюционный анализ морских последовательностей

15:20–17:00. ВЫСТУПЛЕНИЯ ОТОБРАННЫХ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ, НАГРАЖДЕНИЕ ПОБЕДИТЕЛЕЙ КОНКУРСА МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

17:00–17:15. КОФЕ-БРЕЙК

17:15–18:30. ЗАКРЫТИЕ СЪЕЗДА, ПРИНЯТИЕ СОВМЕСТНОГО РЕШЕНИЯ

19:00. ТОВАРИЩЕСКИЙ УЖИН

СТЕНДОВАЯ СЕССИЯ

1 СЕКЦИЯ «ПЕРВИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ ФОТОСИНТЕЗА»

1. **Л.А. Витухновская, М.Д. Мамедов, Г.Е. Милановский, А.Ю. Семенов**
Генерация разности электрических потенциалов пигмент-белковыми комплексами ФС2 в присутствии цитохрома c
2. **Анна Вишневская, Анастасия Петрова,
Георгий Милановский, Алексей Семенов**
Исследование температурной зависимости кинетики рекомбинации зарядов в комплексах фотосистемы 1 в растворе трегалозы
3. **Роман Волошин, Сюйкум Шумилова,
Сергей Жармухамедов, Сулейман Аллахвердиев**
Первичные процессы природного и искусственного фотосинтеза при разных температурах в присутствии осмолитов
4. **Георгий Милановский, Анастасия Петрова,
Дмитрий Черепанов, Алексей Семенов**
Регуляция переноса электрона от филлохинонов A1 к 4Fe-4S кластерам в фотосистеме 1
5. **Антон Христин, Татьяна Фуфина,
Людмила Васильева, Равиль Хатыпов**
Влияние предварительно восстановленного хинона Q_A на температурное заселение состояния P⁺B_A⁻ в реакционных центрах пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides* (заочно)
6. **Антон Грязнов, Ирина Кленина, Зоя Махнева,
Андрей Москаленко, Иван Проскуряков**
Деление возбуждения каротиноидов в светособирающих комплексах и модельных системах

2 СЕКЦИЯ «РЕГУЛЯЦИЯ ФОТОСИНТЕЗА»

7. **Марина Козулева**
Механизмы генерации супероксидного радикала в хлоропластах
8. **И.С. Сусличенко, Б.В. Трубицин, А.В. Вершубский, А.Н. Тихонов**
pH-зависимая регуляция электронного транспорта в хлоропластах *in situ* and *in silico*: неинвазивный метод регистрации электронного переноса между фотосистемами
9. **Лира Давлетшина, Алексей Локтюшкин,
Елена Ловягина, Борис Сёмин**
Взаимосвязь между структурным переходом в марганцевом кластере фотосистемы 2 при pH 5,7 и ее устойчивостью к фотоингибированию и термоинактивации

10. **Анна Шукшина, Василий Терентьев**
Влияние белка карбоангидразы САНЗ на структурно-функциональное состояние водоокисляющего комплекса фотосистемы 2 из *Chlamydomonas reinhardtii*
11. **Е.А. Слуцкая, А.В. Степанов, Н.Н. Случанко, Е.Г. Максимов**
Разработка модульной системы для адресной доставки каротиноидов на основе водорастворимого цианобактериального каротинопротеина *Anabaena* sp. PCC 7120
12. **Наталья Шамаль**
Влияние раздражителей разной природы на синтез фотосинтетических пигментов в этиолированных ростках злаковых культур на свету
13. **Сергей Хрущёв, Владимир Фёдоров, Алексей
Маслаков, Татьяна Плюсина, Илья Коваленко,
Галина Ризниченко, Андрей Рубин**
Моделирование фотосинтетического переноса электронов: от взаимодействия отдельных молекул к агентной модели хлоропласта
14. **Т.Н. Виск, Л.Ф. Кабашникова**
Влияние патогенного гриба *Bipolaris sorokiniana* на фотосинтетическую активность проростков ярового ячменя разного возраста
15. **Маргарита Родионова, Лейла Халилова, Сергей Жармухамедов,
Мехмед Караджан, Нуркан Караджан, Владимир Креславский,
Салех Алвасел, Сулейман Аллахвердиев**
Синтетические металлоорганические комплексы на основе двухвалентной меди ингибируют фотохимическую активность фотосистемы 2 на уровне реакционного центра

3 СЕКЦИЯ «ФОТОРЕЦЕПЦИЯ»

16. **Александра Худякова, Павел Пашковский,
Валерия Строкина, Владимир Креславский**
Роль криптохрома 1 в стрессоустойчивости фотосинтетического аппарата растений *Arabidopsis thaliana* в различных световых условиях
17. **Артемий Суханов, Елена Спирина,
Лада Петровская, Елизавета Ривкина**
Влияние условий культивирования на экспрессию гена родопсина *Exiguobacterium sibiricum*
18. **А.Е. Донцов, М.А. Яковлева, Н.Н. Трофимова, Н.Л. Сакина,
А.А. Гулин, А.В. Айбуш, Ф.Е. Гостев, М.Х. Хубецова,
С.А. Борзенко, Т.Б. Фельдман, М.А. Островский**
Водорастворимые продукты фотоокислительной деструкции A2E и липофусциновых гранул ретинального пигментного эпителия глаза человека вызывают модификацию белков в темноте

4 СЕКЦИЯ «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ, ЛАЗЕРНОЙ И PUVA ТЕРАПИИ»

19 Андрей Белашов, Анна Жихорева, Илья Литвинов, Татьяна Беляева, Елена Корнилова, Ирина Семенова, Олег Васютинский

Исследование процесса накопления фотосенсибилизатора Радахлорин в раковых и псевдонормальных клетках и их реакции на фотодинамическое воздействие

20 Антон Бендиксис, Александр Ашихмин, Андрей Москаленко, Александр Красновский

Каротиноид фитофлуин – эффективный УФ-А фотосенсибилизатор образования синглетного кислорода

21 Валерия Голодная, Сергей Тихонов, Наталья Демчук, Михаил Грин

Карбоксилатные комплексы олова(IV) для комбинированной химио- и фотодинамической терапии (заочно)

22 Мария Соколова, Анастасия Игнатова,

Петр Островерхов, Анастасия Ефременко, Михаил Грин, Андрей Миронов, Алексей Феофанов

Клеточные и фотодинамические свойства гуанидинового производного хлорина е6, инкапсулированного в наночастицы

23 А.Н. Константинова, И. Именес-Мунгуйя,

А.К. Федоров., К.И. Макринский, Ю.А. Ермаков, И.Н. Мешков, Ю.Г. Горбунова, В.С. Соколов

Катионные порфирины с фосфором(V): влияние структуры на адсорбцию и фотодинамическую активность на бислойных липидных мембранах

24 Сергей Летута, Азамат Ишемгулов, Дмитрий Раздобреев,

Юрий Лантух, Эскендер Алиджанов

Инактивация бактерий *Salmonella typhimurium* и *Staphylococcus aureus* в растворах и биопленках в присутствии сенсбилизаторов

25 Петр Островерхов, Никита Кириин, Светлана

Степанькова, Анастасия Шелягина, Дарья Петрова, Евгения Ростиашвили, Михаил Грин

Природные хлорины как платформа для создания препаратов для комбинированной химиотерапии и фотодинамической терапии

26 Л.Б. Попова, Е.А. Котова, Ю.Н. Антоненко

Фотодинамическое действие бенгальского розового на электрическую активность нейронов прудовика

27 И.А. Серебрякова, Ю.И. Сурков, Э.А. Генина, Е.Н. Лазарева, Я.К. Кузинова, О.М. Конопацкова, А.Н. Башкатов, В.В. Тучин

Применение мультимодального метода исследования новообразований кожи человека при оптическом просветлении *in vivo* для повышения эффективности ФДТ

28 Полина Старыгина, Анна Хуснутдинова, Ольга Чудакова, Анатолий Цыганков

Интенсификация культивирования пурпурной несерной бактерии *Cereibacter sphaeroides* ВКМ В-3534D – продуцента бактериохлорофилла *a*

29 Ю.И. Сурков, И.А. Серебрякова, Э.А. Генина, А.Н. Башкатов, В.В. Тучин

Сравнительное исследование оптического просветления кожи человека с различной степенью пигментации

30 Ольга Чудакова, Анна Хуснутдинова, Татьяна Лауринавичене, Полина Старыгина, Анатолий Цыганков

Пурпурная несерная бактерия *Cereibacter sphaeroides* ВКМ В-3534D – продуцент бактериохлорофилла *a*

31 Г.С. Юстус, Д.А. Притьмов, М.А. Грин, А.Ф. Миронов, М.А. Павлова, П.А. Панченко, О.А. Фёдорова, Н.Б. Морозова, А.Д. Плютинская, А.А. Панкратов

Анализ фотобиологических свойств бактериохлорин-нафталимидных конъюгатов на клетках саркомы S37

32 Александр Микулич, Антонина Третьякова, Татьяна Ананич, Роман Нагорный, Игорь Леусенко, Людмила Плавская, Валерий Сысов, Ольга Дудинова, Виталий Плавский

Потенциал использования фитопрепаратов в качестве натуральных фотосенсибилизаторов для антимикробной фотодинамической терапии

33 Антон С. Козлов, Ольга Н. Егорова, Олег И. Медведков, Александр А. Красновский

Исследование абсорбционных свойств молекулярного кислорода в диапазоне 810–1080 нм в аэробных растворах при физиологических условиях

34 Л.О. Соколова, П.Е. Палкина, О.В. Путинцева, В.Г. Артюхов

Исследование спектральных характеристик эритроцитов крови доноров, модифицированных широким диапазоном доз УФ-света (254 нм)

35 Антон С. Бендиксис, Антон С. Козлов, Сергей Е. Гончаров, А.А. Красновский

Флуоресцентный анализ активации молекул кислорода в аэробных растворах красным лазерным излучением. Выявление Фраунгоферовых полос А и Б в спектрах поглощенного растворенного кислорода (online)

36 Антон С. Козлов, Олег Б. Любичский, Александр А. Красновский, Анатолий Н. Осипов

Влияние прямой активации главных абсорбционных полос кислорода на фагоцитарную активность лейкоцитов кролика (online)

5 СЕКЦИЯ «БИОФОТОНИКА МОЛЕКУЛ И НАНОЧАСТИЦ»

37 **Алла Бучарская, Дмитрий Мудрак,****Ирина Янина, Никита Наволокин, Алексей Башкатов,****Элина Генина, Юрий Кистенев, Валерий Тучин**

Морфологические изменения в ткани легких крыс при ингаляции аэрозоля жидкости для электронных сигарет на основе полипропиленгликоля и глицерина

38 **Анна Доронкина, Наталия Казадаева, Екатерина Козлова,****Ирина Янина, Александр Скапцов, Юлия Конюхова,****Александр Правдин, Вячеслав Кочубей, Артём Мыльников**

Влияние белковой оболочки на взаимодействие наночастиц с эритроцитами

39 **Наталия Казадаева, Анна Доронкина, Екатерина Козлова,****Ирина Янина, Александр Скапцов, Юлия Конюхова,****Александр Правдин, Вячеслав Кочубей, Артём Мыльников**

Влияние внутривенного введения наночастиц на определение температуры биоткани по спектру люминесценции апконверсионных наночастиц через слой биоткани при различных условиях

6 СЕКЦИЯ «БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ И ФОТОНИКА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ»

40 **Елена Протасова, Александр Мишин, Константин Лукьянов,****Евгений Максимов, Алексей Богданов**

Псевдофотоконверсия на примере флуоресцентного белка mKate2

41 **И.С. Коротов, С.В. Маркова**

Делеционные мутанты люциферазы *Metridia longa* как перспективные биолюминесцентные репортеры

7 СЕКЦИЯ «МИКРОВОДОРОСЛИ КАК ПРЕОБРАЗОВАТЕЛИ СОЛНЕЧНОЙ ЭНЕРГИИ В БИОТОПЛИВА И ЦЕННЫЕ ПРОДУКТЫ»

42 **Л.А. Бобровникова, А.Ю. Стариков, Д.А. Габриелян, М.А. Синетова**

Влияние минерального голодания на распределение углерода между крахмалом и триглицеридами у зеленых микроводорослей

43 **М.Х. Хасимов, Е.П. Петушкова, А.Н. Хуснутдинова,****А.А. Цыганков, Стародубов А.А.**

Роль С-концевого фрагмента малой субъединицы HydSL-гидрогеназы пурпурной серной бактерии *Thiocapsa bogorovii* в локализации фермента и его взаимосвязи с восстановлением серы

44 **А.С. Стародубов, Н.А. Зорин, А.Н. Хуснутдинова,****М.Х. Хасимов, А.А. Цыганков**

Реконструкция hydsl гидрогеназы *Thiocapsa bogrovii* BBS после ингибирования цианидом

45 **Д.А. Габриелян, Б.В. Габель, М.А. Синетова,****А.К. Габриелян, А.Г. Маркелова, Д.А. Лось**

Плоскостной фотобиореактор закрытого типа для культивирования микроводорослей практического назначения

46 **Айшат Бозиева, Мария Синетова, Елена Куприянова,****Сергей Жармухамедов, Сулейман Аллахвердиев**

Поиск фототрофных микроорганизмов, перспективных для получения биотоплива

47 **Надежда Чернова, Софья Киселева, Михаил Власкин**

Экспериментальное получение широкой линейки биотоплив из биомассы микроводорослей (online)

48 **Татьяна Новикова**

Содержание хлорофилла в биомассе морских микроводорослей при световом лимитировании

49 **Екатерина Майорова, Е.П. Петушкова, А.А. Цыганков**

Сравнение и оптимизация подходов генетической модификации *Rhodobacter capsulatus*

8 СЕКЦИЯ «ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ФОТОБИОЛОГИЯ»

50 **Е. Громова, Е. Сухова, Ю. Синицина, Н. Мшенская,****А. Рябкова, В. Воденеев, В. Сухов**

Влияние магнитного поля с частотами резонанса Шумана на фотосинтетические реакции проростков пшеницы и гороха

51 **Диана Киселева, Роман Червицов, Дарья Тодоренко,****Елена Воронова, Сергей Хрушев, Татьяна Плюснина**

Выявление токсического действия тяжелых металлов на проростки гороха *Pisum sativum* методами машинного обучения

52 **Галина Настинова**

Фотосинтетические основы высокой продуктивности амаранта в аридных условиях (заочно)

53 **Валерия Слепнёва, Ольга Лихачева, Алёна Волгушева, Тарас Антал**

Исследование воздействия тяжелых металлов на фотосинтез лишайников для применения в экологическом мониторинге

54 **Дарья Тодоренко, Алёна Волгушева, Дмитрий Маторин, Тарас Антал**

Воздействие кадмия и хрома на фотосинтетическую активность гороха (*Pisum sativum* L.)

55 **Александр Хмарик, Ольга Войцеховская, Виктория Дубовицкая**

Оценка влияния концентраций тяжелых металлов в почве и в хвое на состояние фотосинтетического аппарата *Picea pungens* Engelm. в насаждениях Санкт-Петербурга с применением JIP-тестов.

СЕКЦИЯ 1. ПЕРВИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ ФОТОСИНТЕЗА

РОЛЬ ХЛОРОФИЛЛА *f* В ФОТОСИСТЕМЕ I ДЛЯ АДАПТАЦИИ К УСЛОВИЯМ ОСВЕЩЕНИЯ ДАЛЬНИМ КРАСНЫМ СВЕТОМ

The role of chlorophyll *f* in photosystem I for adaptation to far-red light conditions

Коджи Като¹, Тошиюки Шинода², Рио Нагао¹,
Фузамичи Акита¹, Наююки Миязаки¹, Джиан-Рен Шен¹, Татцую Томо²,
Сулейман И. Аллахвердиев^{3,4*}

1 – Национальный университет Окаямы, Окаяма, Япония

2 – Токийский университет науки, Токио, Япония

3 – Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

4 – Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Московская обл., Россия

*e-mail: suleyman.allakhverdiev@gmail.com

У фотосинтезирующих организмов хлорофиллы (Хл) играют важную роль в процессах сбора света, передаче энергии и переносе электронов. Для эффективного использования различных спектральных компонентов солнечной энергии, оксифототрофы приобрели виды Хл, различные по своей молекулярной структуре и областям в спектрах поглощения. Обнаружено, что в бактериальных матах Хл *f*-содержащие организмы распространены на 4–6.5 мм под поверхностью, где интенсивность дальнего красного света сильнее, чем интенсивность фотосинтетически активной радиации. Тем не менее, местоположение и точная функция Хл *f*, способного поглощать в дальней красной области спектра, в фотосистемах до сих пор оставались неясными. Мы проанализировали структуры коровых комплексов ФС-1 в высоком разрешении у *Halomicronema hongdechloris*, выращенной на белом и дальнем красном свете с помощью метода криоэлектронной микроскопии. При анализе структур тримеров ФС-1 *H. hongdechloris* в разных световых условиях выявлено наличие 7 молекул Хл *f*, расположенных в периферийной области кора ФС-1 в клетках, выращенных на дальнем красном свете. При этом появление Хл *f* коррелирует с экспрессией генов ФС-1, которые активируются дальним красным светом. Показано, что все 7 молекул Хл *f* не связаны с ЭТЦ напрямую, а функционируют для усиления переноса энергии возбуждения к молекулам хлорофилла реакционного центра, а также в процессах тушения.

Работа была поддержана Российским научным фондом (грант 19-14-00118).

ФОТОИНДУЦИРОВАННОЕ ОБРАЗОВАНИЕ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА У ПУРПУРНЫХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ Photoinduced formation of singlet oxygen in purple photosynthetic bacteria

Александр Ашихмин*, Зоя Махнева, Максим Большаков, Андрей Москаленко

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Московская область, 142290, Россия

*e-mail: AshikhminAA@gmail.com, тел. +7(4967)731849

Изучение влияния синглетного кислорода на процессы в клетках несерных и серных бактерий представляет большой интерес поскольку он является сильным природным окислителем и имеет множество мишеней в клетке, включая белки, липиды, пигменты, а также может выступать в качестве сигнальной молекулы. Ранее было установлено, что синглетный кислород может образовываться в клетках несерных бактерий на свету в аэробных условиях [1]. Проводя исследования на серных бактериях, мы пришли к заключению, что их мембраны могут быть удобным объектом для исследования разных аспектов взаимодействия синглетного кислорода с фотосинтетическими пигментами (бактериохлорофилл (БХл) и каротиноиды).

В данной работе была проведена оценка выделения синглетного кислорода мембранами ряда серных (*Allochrochromatium* (*Alc.*) *vinosum* шт. МГУ) и несерных (*Rhodobacter* (*Rba.*) *sphaeroides* шт. 2R, *Rba. sphaeroides* шт. G1C, *Rba. blasticus* шт. K-1, *Rhodospseudomonas* (*Rps.*) *faecalis*) бактерий при их облучении светом разного спектрального состава: красным (поглощение БХл) и белым (поглощение БХл и каротиноидов). Детектирование синглетного кислорода проводили флуориметрическим методом анализа с применением высокоселективной флуоресцентной ловушки синглетного кислорода – Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG), которая при взаимодействии с синглетным кислородом переходит во флуоресцирующую эндопероксидную форму [2].

Было обнаружено, что при освещении красным светом фотосинтетических мембран *in vivo* (светофильтр KC-11, $\lambda > 600$ нм, 420 Вт/м²) выделение синглетного кислорода не происходит. Это указывает на то, что БХл в данном процессе не принимает участие. На белом свету (700 Вт/м²) при увеличении продолжительности освещения регистрируется повышение уровня флуоресценции SOSG в мембранах *Alc. vinosum* МГУ, *Rba. sphaeroides* G1C, *Rba. blasticus* K-1 и *Rps. faecalis*. У *Rba. sphaeroides* увеличение сигнала флуоресценции SOSG не отмечено. На основании полученных данных мы предполагаем, что на белом свету указанный процесс образования синглетного кислорода в мембранах указанных выше бактерий может происходить за счет пигментов, поглощающих в сине-зеленой области спектра, т.е. каротиноидов с количеством сопряженных двойных связей 8–11 (ликопин, родопин, нейроспорин и сфероиден).

Работа выполнена при частичной поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (МК-1352.2021.1.4).

- Berghoff, B.A., Glaeser, J., Nuss, A.M., Zobawa, M., Lottspeich, F., & Klug, G. Anoxygenic photosynthesis and photooxidative stress: a particular challenge for Roseobacter // *Environmental Microbiology*. 2011. V. 13. № 3. P. 775–791
- Kim, S., Fujitsuka, M., & Majima, T. Photochemistry of Singlet Oxygen Sensor Green // *The Journal of Physical Chemistry B*. 2013. V. 117. № 45. P. 13985–13992

**АНАЛИЗ КИНЕТИКИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ *IN VIVO* ДЛЯ
МОДЕЛИРОВАНИЯ ПОТОКОВ ЭЛЕКТРОНОВ В ТИЛАКОИДНЫХ
МЕМБРАНАХ ВОДОРОСЛИ *SCENEDESMUS OBLIQUUS***

Modeling the light driven electron flows in the thylakoid membranes of the green alga *Scenedesmus obliquus* based on analysis of chlorophyll a fluorescence transients

N. E. Belyaeva, A. A. Bulychev, K. E. Klementiev, G. Yu. Riznichenko, A. B. Rubin

Department of Biophysics, Biology Faculty of the M.V. Lomonosov Moscow State University, 119992, Moscow, Russia

*e-mail: natalmurav@yandex.ru

In plants and green algae exposed to light, the Chl *a* fluorescence induction (FI) curve shows an initial fast OJIP rise to the P maximum in hundreds of milliseconds. In the subsequent few minutes, slow PSMT phase decreases via semi-steady S state and local maximum M to a terminal (close to F_0) steady-state T level of fluorescence emission [1, 2]. The MT decline in the fluorescence was assigned [2] to the (non)photochemical quenching related to electron flows through photosystems II, I (PSII, PSI) taking place during the light activation of stromal Calvin-Benson cycle. Also, parallel detection of fluorescence curves and CO₂ fixation [3] indicated the correlation at the onset of CO₂ assimilation and S-M transient. Complexity of the energy fluxes associated with electron transport in chloroplast compartments indicates that quantitative methods developed recently in Thylakoid model [4–6] need to be improved in order to analyze FI data during induction to steady-state photosynthesis. In the present study, the dark-to-light transitions in the green alga *Scenedesmus obliquus* (*Scenedesmus*) were tested *in vivo* on the basis of FI data measured in ten minutes interval upon PFD 1200 and 1800 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Fluorescence kinetics for *Scenedesmus* cells show the fast OJIP rise with a subsequent wave labeled S₂M₂ preceding the decrease to ‘T’ terminal state while the small intermediate wave S₁M₁ [2] is seen for the high light intensity. It was proposed that, during the slow S₂M₂T transient, qE and State 2-to-State 1 transition [7] are interrelated. The Thylakoid model allowed us to calculate the qE and FNR activation parameters to fit accurately OJIP(S)T *Scenedesmus* transients with a decrease to ‘T’ terminal state. The buildup of reduced PQH₂, Fd, NADPH pools was found with this “first” fitting approximation. The adjustment of parameters is needed to test the events possibly related to state transitions in plants and algae due to the redox state of the PQ pool “sensed” at the Q_o site (luminal) of the Cyt *b₆f* complex. As a result, reversible phosphorylation of the mobile LHCII of PSII triggers State 1(2) to State 2(1) transitions. Theoretical changes in antenna complex sizes [6] can be modeled with regard to the PQ/PQH₂ pool state. Also, the OJIPSM dynamic features should be compared for the effects of state transitions and NADPH pool accumulation in stroma before the onset of active CO₂ fixation.

1. Papageorgiou GC, Tsimilli-Michael M, Stamatakis K (2007) *Photosynth Res* 94:275–290
2. Stirbet A, Govindjee (2012) *Photosynth Res* 113:15–61
3. Ireland C.R., Long S.P., Baker N.R. (1984) *Planta* 160, 550–558
4. Belyaeva NE, Bulychev AA, Riznichenko GYu, Rubin AB (2016) Thylakoid membrane model of the Chl *a* fluorescence transient and P700 induction kinetics in plant leaves. *Photosynth Res* 130, 491–515
5. Belyaeva N, Bulychev A, Riznichenko G, Rubin A (2019) *Photosynth Res* 140:1-19.
6. Belyaeva N, Bulychev A, Klementiev K, et al. (2020) *Photosynth Res* 146(1):259-278
7. Kodru S, et al. (2015) *Photosynth Res* 125(1–2):219–231

**ОСОБЕННОСТИ СБОРКИ СВЕТОСОБИРАЮЩИХ КОМПЛЕКСОВ
LH2 ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ БИОСИНТЕЗА КАРОТИНОИДОВ
У СЕРНЫХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ**
**Characteristic of the assembly of LH2 light-harvesting complexes in the inhibition of
carotenoid biosynthesis in sulfur photosynthesis bacteria**

Максим Большаков*, Александр Ашихмин, Зоя Махнева, Андрей Москаленко

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, Московская область, 142290, Россия

*e-mail: lfbv22@gmail.com, тел. +7(4967)731849

Основной задачей исследования было выяснить, как ингибирование процесса биосинтеза каротиноидов (изменение их качественного и количественного состава) влияет на сборку светособирающих комплексов в клетках трех типов серных бактерий: *Allochrochromatium (Alc.) vinosum*, *Thiorhodospira (T.) sibirica* Kir-3 и *Thermochrochromatium (T.) tepidum*, а также на изменение свойств этих комплексов. Особенностью *T. sibirica* является то, что в ее мембранах содержатся комплексы LH2 типа B800-830 и B800-850, которые собираются без изменений вне зависимости от условий культивирования. Поэтому было интересно попытаться получить эти комплексы LH2, которые содержали бы минимально возможное количество каротиноидов. Одной из характерных особенностей комплекса LH2 (B800-850) из *Alc. vinosum* являются их конформационные переходы. Варьируя условия выращивания культуры в клетках этой бактерии могут собираться как комплекс LH2 типа B800-850, так и B800-840 или даже B800-820. Особое внимание привлекает серная бактерия *T. tepidum*. Она была выделена Мадиганом в 1984 г. из термальных источников Йеллоустонского национального парка и отличается от всех известных пурпурных бактерий тем, что ее оптимальная температура роста составляет около 50°C (Madigan, 1984). Термоустойчивость этой бактерии делает возможным получение более стабильных комплексов LH2 с минимальным содержанием каротиноидов, поскольку известно, что у *Alc. vinosum* и *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* бескаротиноидные комплексы LH2 очень лабильны и легко разрушаются при воздействии температуры и детергентов.

Было показано, что у *T. sibirica* штамм Kir-3 можно подавить биосинтез каротиноидов на ~ 90%. Таким образом, эта бактерия может рассматриваться как объект для изучения роли и функций каротиноидов в светособирающих комплексах LH2 типа B800-830 и B800-850. Также были получены фотосинтетические мембраны и комплексы с разным качественным и количественным содержанием каротиноидов (10–100%) и изучен их пигментный состав. Содержание каротиноидов в комплексах LH2 из *Alc. vinosum*, выделенных из ДФА-клеток, составило: в ДФА-комплексе B800-850 ~ 15%, а в ДФА-комплексах B800-820 и B800-840 – ~ 20% от контроля (без ингибирования дифениламином (ДФА)). В случае *T. tepidum* самым лучшим результатом из всех повторений стали клетки с 40% содержанием каротиноидов.

В выделенных комплексах проведена оценка эффективности переноса энергии с каротиноидов на бактериохлорофилл. Зарегистрированы спектры поглощения и кругового дихроизма и изучен каротиноидный состав всех выделенных комплексов.

Поиск пурпурных серных бактерий, у которых можно полностью ингибировать биосинтез каротиноидов, является важной задачей, поскольку, это позволит лучше понять механизм сборки этих комплексов *in vivo*, а также только подавив биосинтез каротиноидов можно провести сравнительный анализ и установить свойства и механизмы функционирования этих пигментов в пигмент-белковых комплексах.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (МК-1352.2021.1.4).

УЧАСТИЕ БЕЛКА В ТОНКОЙ ПОДСТРОЙКЕ РЕДОКС-ПОТЕНЦИАЛА ПЕРВИЧНОГО ДОНОРА ЭЛЕКТРОНА В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ ПУРПУРНЫХ БАКТЕРИЙ

Т. Ю. Фуфина¹, Г. К. Селиханов^{1,2}, О. А. Третчикова¹, А. Г. Габдулхаков²,
Д. Г. Васильева¹

1 – ФИЦ ПНЦБИ РАН, ИФПБ РАН г. Пушкино. 142290 г. Пушкино Московской обл.,

ул. Институтская, 2

2 – Институт белка РАН г. Пушкино

*e-mail: vsyulya@mail.ru, факс +7(4967)33-0532

Солнечная энергия трансформируется в химическую энергию и запасается в клетках живых организмов, способных к фотосинтезу. Фотосинтетический реакционный центр (РЦ) пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides* является структурным аналогом более сложно устроенной фотосистемы-2 высших растений и водорослей. Это интегральный пигмент-белковый комплекс, состоящий из трех белковых субъединиц, с которыми нековалентно связаны десять кофакторов. Кофакторы представлены четырьмя молекулами бактериохлорофилла (БХл), двумя молекулами бактериофеофитина, двумя хинонами, атомом негемового железа и молекулой каротиноида и организованы в две псевдо-симметричные цепи переноса электрона, А и В, из которых только цепь А функционально активна. Фотохимическая реакция в РЦ начинается с поглощения кванта света и перехода первичного донора электрона, димера БХл Р, в возбужденное состояние с последующей передачей электрона от Р* на ближайший акцептор, мономерный БХл, и далее по цепи кофакторов. Квантовая эффективность первых стадий фотохимического разделения зарядов в РЦ, происходящих в пико- и наносекундном диапазоне времени, чрезвычайно высока (около 100%).

Экспериментальные данные, накопленные к настоящему времени, свидетельствуют о том, что белок РЦ не только связывает хромофоры внутри мембраны на определенном расстоянии и в определенной ориентации относительно друг друга, но также определяет природу бактериохлорофиновых кофакторов, может влиять на их спектральные свойства и редокс-потенциал. Кроме того, колебательные и конформационные движения белка способствуют протеканию прямых реакций и затрудняют обратные реакции. В докладе будут представлены данные по расшифровке кристаллической структуры РЦ *Rhodobacter sphaeroides* с аминокислотным замещением F(M197)H, позволяющие объяснить ряд свойств этого мутантного комплекса и предоставляющие возможность по-новому взглянуть на участие белкового окружения в тонкой подстройке редокс-свойств первичного донора электрона.

ГЕНЕРАЦИЯ РАЗНОСТИ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПОТЕНЦИАЛОВ ПИГМЕНТ-БЕЛКОВЫМИ КОМПЛЕКСАМИ ФС2 В ПРИСУТСТВИИ ЦИТОХРОМА С

Л. А. Витухновская, М. Д. Мамедов, Г. Е. Милановский, А. Ю. Семенов

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

*e-mail: vitlia@yahoo.com

С помощью прямого электрометрического метода было исследовано влияние цитохрома *c* (цит *c*) на индуцированные лазерными вспышками света электрогенные реакции переноса электронов ($\Delta\psi$) в протеолипосомах, содержащих фотосистемы 2 (ФС2). Генерация $\Delta\psi$ за счет переноса электронов от экзогенно добавленного восстановленного цит *c* (цит c^{2+}) к окисленному тирозину Y_z с характерным временем ~ 70 мкс (относительная амплитуда $\sim 20\%$) была продемонстрирована в протеолипосомах, содержащих ядерные комплексы ФС2, лишённые ионов марганца и периферических белков. Мы предполагаем, что цит c^{2+} может служить наиболее эффективным искусственным донором электронов для комплекса ФС2.

В препаратах интактных ядерных комплексов ФС2 в присутствии окисленного цит *c* (цит c^{3+}), находящегося внутри липосом, в ответ на вспышку лазера наблюдалась быстрая генерация потенциала, связанная с переносом электрона от редокс-активного тирозина Y_z на первичный акцептор электрона Q_A , с последующей электрогенной компонентой ($\tau \approx 40$ мкс, амплитуда $\sim 10\%$). Эта фаза связана с векторным переносом электрона от Q_A^- на цит c^{3+} , действующий в качестве акцептора электронов.

Так же нами были исследованы возможные структурные особенности взаимодействия цит *c* и ФС2. Данные об электрогенных реакциях ФС2 с цит c^{2+} или цит c^{3+} могут быть использованы в фотоэлектрохимических исследованиях.

Работа была выполнена в рамках госзадания ФНИЦК РАН (АААА-А19-119012990175-9).

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОЙ ЗАВИСИМОСТИ КИНЕТИКИ РЕКОМБИНАЦИИ ЗАРЯДОВ В КОМПЛЕКСАХ ФОТОСИСТЕМЫ I В РАСТВОРЕ ТРЕГАЛОЗЫ
Temperature dependence of charge recombination kinetics of photosystem I complex in trehalose solution

Анна Вишневецкая^{1,2}, Анастасия Петрова², Георгий Милановский², Алексей Семенов²

1 – Биологический факультет МГУ имени М. В. Ломоносова

2 – НИИ Физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского МГУ

им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: ai.vish@yandex.ru, тел. +7 916 393-11-27

Впервые показано влияние высоких концентраций трегалозы в растворе на кинетику переноса электрона в фотосистеме I из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803, а также исследованы возможные механизмы, объясняющие наблюдаемые изменения. Редокс-превращения первичного донора электрона P_{700} были зарегистрированы методом импульсной лазерной абсорбционной спектроскопии с микросекундным временным разрешением: в диапазоне температур от -10 до $+25^\circ\text{C}$ и при концентрации трегалозы в растворе от $0,1$ М до 2 М. Был выявлен эффект концентрированного раствора трегалозы как на взаимодействие фотосистемы с экзогенными акцепторами, так и на перенос электрона в самом пигмент-белковом комплексе. Для экспериментов использовались как полные комплексы фотосистемы I, так и комплексы с удаленными терминальными кофакторами.

Было показано, что с увеличением концентрации трегалозы затрудняется перенос электрона от фотосистемы I к экзогенному акцептору. Кроме того, увеличение концентрации трегалозы в растворе замедляет рекомбинацию зарядов с $(F_{A/B})^+$ на P_{700}^+ . На основе произведенных измерений была оценена энергия активации реакций рекомбинации зарядов в ФС I в диапазоне температур от -10 до $+25^\circ\text{C}$, которая в растворе трегалозы и в контрольном водном растворе составила ~ 30 кДж/моль во всем исследуемом диапазоне температур. Это значение отличается от ранее полученных в нашей лаборатории данных о температурной зависимости редокс-превращений P_{700} в водно-глицериновой смеси [1], где при температурах ниже 0°C происходит изменение пути обратного переноса электрона на прямую рекомбинацию с железо-серных кластеров на P_{700} в обход филлохинона A_{1A} , сопровождаемое существенным уменьшением энергии активации этой реакции. Полученный результат свидетельствует о перспективных свойствах трегалозы, как протекторного вещества, по сравнению с глицерином.

Кроме того, особенности переноса электрона в фотосистеме I в растворе трегалозы были изучены на комплексах фотосистемы I с удаленным терминальными кофакторами. В результате исследований температурных зависимостей кинетики редокс-превращений P_{700} в модифицированных комплексах удалось показать влияние трегалозы в растворе на конформационную подвижность отдельных субъединиц фотосистемы I, а также выявить особенности переноса электронов по цепи кофакторов, позволяющие объяснить замедление кинетики реакций рекомбинации.

Работа поддержана грантом РФФИ № 21-74-10085.

1. Milanovsky et al (2019) *BBA-Bioenergetics* 1860(8):601-610

ПЕРВИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПРИРОДНОГО И ИСКУССТВЕННОГО ФОТОСИНТЕЗА ПРИ РАЗНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ В ПРИСУТСТВИИ ОСМОЛИТОВ
Primary processes of natural and artificial photosynthesis at different temperatures in the presence of osmolytes

Роман Волошин¹, Сьюкум Шумилова¹, Сергей Жармухамедов², Сулейман Аллахвердиев^{1,2*}

1 – Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, г. Москва,

ул. Ботаническая, д. 35, 127276

2 – Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Московская область, г. Пушкино,

ул. Институтская, д. 2, 142290

*e-mail: suleyman.allakhverdiev@gmail.com, тел. +7 9251316996

Преобразование солнечной энергии во время первичных процессов фотосинтеза происходит с высоким квантовым выходом. Поэтому фотосинтетические мембраны и пигмент-белковые комплексы рассматриваются как модельные объекты или как основные сенсibilizаторы при конструировании систем искусственного фотосинтеза. Термин искусственный фотосинтез определяет всю область знаний, связанную как с полностью искусственными системами, имитирующими природный процесс, так и с гибридными преобразователями солнечного света, в которых содержатся как фотосинтетические пигмент-белковые комплексы, так и электроды небиологического происхождения. Такие гибридные преобразователи называются фотобиоэлектрохимическими ячейками (ФБЭЯ).

Первичные процессы фотосинтеза; выделение кислорода и диффузия подвижных переносчиков электронов, а также целостность и среднее время жизни пигмент-белковых комплексов во многом определяются температурой окружающей среды. Фотосинтетические белки, выделенные из своего нативного окружения и иммобилизованные в ФБЭЯ лишены репарационного и многих защитных механизмов, имеющихся в живой клетке. Поэтому они особенно нуждаются в искусственных стабилизирующих системах. Одной из таких систем являются высококонцентрированные растворы осмолитов, в которых процессы разрушения протекают существенно медленнее.

В данной работе мы исследовали влияние трегалозы, сахарозы и глицин-бетаина на фотосинтетическую активность тилакоидных мембран, выделенных из шпината огородного (*Spinacia oleracea* L.), а также на фототок, который генерировали ФБЭЯ, сенсibilizированные этими мембранами при действии стрессовых факторов. Использовался метод импульсной флуориметрии и полярографический метод измерения скорости фотовыделения кислорода для оценки фотосинтетической активности. Получены новые данные сравнения влияния температур в диапазоне от 10 до 45 градусов на оба вышеуказанных параметра. Наиболее термоустойчивыми с точки зрения активности первичных процессов фотосинтеза оказались препараты с трегалозой, в то время как наибольший ток был получен в ФБЭЯ, содержащих сахарозу. Таким образом показана, возможность увеличения стресс-устойчивости компонентов фотосинтетических пигмент-белковых комплексов в суспензии и в структуре ФБЭЯ.

Работа поддержана Российским научным фондом, грант 19-14-00118.

ГЕНЕРАЦИЯ СВЕТОЗАВИСИМОЙ РАЗНОСТИ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПОТЕНЦИАЛОВ ПИГМЕНТ-БЕЛКОВЫМИ КОМПЛЕКСАМИ ФОТОСИСТЕМ 1 И 2, АДсорБИРОВАННЫМИ НА МИЛЛИПОРОВОМ ФИЛЬТРЕ, В ОТВЕТ НА СТАЦИОНАРНОЕ ОСВЕЩЕНИЕ

М. Д. Мамедов*, Л. А. Витухновская, А. А. Заспа, А. М. Мамедова, А. Ю. Семенов

НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия
*e-mail: mahirmamedov@yandex.ru

Разработана система измерения для регистрации длительной генерации светозависимой разности электрических потенциалов (ΔV) пигмент-белковыми комплексами фотосистем (ФС) 1 и 2 из цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803 и шпината, соответственно. Система состояла из комплексов ФС1 (или ФС2), адсорбированных на пористом мембранном фильтре (МФ) Millipore, помещенном между двумя полупроводниковыми электродами из оксидов индия и олова (ИТО), соединенных медными проволоками с операционным усилителем. Способность системы ИТО|ФС1-МФ|ИТО генерировать стабильную ΔV в течение 50-минутного освещения белым светом при комнатной температуре была выявлена в присутствии цитохрома c_6 , метилвиолгена и дисахарида трегалозы. ΔV , генерируемое системой ИТО|ФС1-МФ|ИТО, в присутствии окислительно-восстановительной пары аскорбат/2,6-дихлорфенолиндофенол в качестве донора(ов) электронов, вместо цитохрома c_6 , было менее стабильным.

На комплексах ФС2 было показано, что они участвуют в переносе электронов от воды как донора электронов к ИТО-электроду, что приводит к генерации ΔV . Максимальный по амплитуде и стабильный фотоэлектрический сигнал наблюдался в присутствии дисахарида трегалозы и 2,6-дихлор-1,4-бензохинона, играющего роль окислительно-восстановительного медиатора между первичным хинонным акцептором Q_A и поверхностью электрода.

Разработанная нами система представляет собой простой и стабильный гибридный преобразователь солнечной энергии в электричество на основе фотосинтетических реакционных центров, МФ и стеклянных полупроводниковых электродов.

Работа была поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант 18-43-160017 p_a), ФНИЦК РАН (AAAA-A19-119012990175-9), а также грантом РНФ № 19-14-00366.

РЕГУЛЯЦИЯ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА ОТ ФИЛЛОХИНОНОВ A_1 К 4Fe-4S КЛАСТЕРАМ В ФОТОСИСТЕМЕ 1
Control of rates of electron transfer from phyloquinones A_1 to 4Fe-4S clusters in photosystem I

Георгий Милановский^{1*}, Анастасия Петрова¹, Дмитрий Черепанов², Алексей Семенов¹

1 – НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия
2 – ФИЦ химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва, Россия
*e-mail: milanovsky@genebee.msu.ru, тел. +7 903 7726043

Пигмент-белковый комплекс фотосистемы 1 (ФС1) цианобактерий и высших растений оптимизирован для высокоэффективного переноса электрона на природные экзогенные акцепторы электрона ферредоксин (или флаводоксин). При этом необходимо не допустить восстановления других возможных экзогенных акцепторов (например, молекулярного O_2 с образованием активных форм кислорода) низкопотенциальными кофакторами цепи переноса электрона, в первую очередь – филлохинонами A_1 . По этой причине перенос электрона от A_{1A} и A_{1B} в симметричных ветвях кофакторов А и В к железо-серному кластеру F_X и далее на кластеры F_A/F_B , по-видимому, требует особо тонкого регулирования, механизм которого не вполне ясен к настоящему моменту.

Анализ имеющихся экспериментальных данных по кинетике переноса электрона в ФС1 различной структуры, при различных температурах [1], при наложении конформационных ограничений [2] и с точечными аминокислотными заменами в окрестностях A_1 и F_X [3, 4] позволяет заключить, что тонкая настройка данной реакции осуществляется не только за счет модификаций редокс-потенциалов кофакторов и диэлектрических свойств окружающего белкового матрикса. Для достижения оптимальной скорости переноса электрона, вероятно, необходимо формирование сети водородных связей во внутрибелковых водных кластерах (карманах) между A_1 и F_X . Изучение данного участка в ФС1 из различных фотосинтезирующих организмов представляет интерес для выяснения принципов регуляции переноса электрона в биологических системах.

Работа поддержана грантом РНФ № 19-14-00366.

1. Milanovsky et al, *BBA-Bioenergetics*, 1860(8), 2019, 601–610
2. Malferrari et al, *BBA-Bioenergetics*, 1857(9), 2016, 1440–1454
3. Milanovsky et al, *BBA-Bioenergetics*, 1837(9), 2014, 1472–1483
4. Kurashov et al, *Photosynth Res*, 2021, DOI: 10.1007/s11120-021-00839-x

**ВЛИЯНИЕ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ ВБЛИЗИ P700 НА ПЕРВИЧНЫЕ РЕАКЦИИ
РАЗДЕЛЕНИЯ ЗАРЯДОВ И ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА В ФОТОСИСТЕМЕ I**
Effect of point mutations near the P700 to the primary reaction charge separation
and electron transfer in photosystem I

**Виктор Надточенко^{1*}, Иван Шелаев¹, Федор Гостев¹, Дмитрий Черепанов¹,
Арсений Айбуш¹, Анастасия Петрова², Алексей Семенов²**

1 – ФИЦ ХФ РАН

2 – НИИФХБ МГУ

*e-mail: nadtochenko@gmail.com, тел. +79152269347

Исследовались ультрабыстрые первичные реакции фотоиндуцированного разделения зарядов в фотосистеме I (ФС1) цианобактерий и участие в них дополнительных молекул хлорофилла, Chl2A и Chl2B, которые непосредственно примыкают к специальной паре P700 и дают начало двум симметричным ветвям A и B переноса электрона. Остатки аспарагина PsaA-N600 и PsaB-N582, которые координируют Chl2B и Chl2A через мостиковые молекулы H₂O, были заменены на Met, His и Leu. Измерялась сверхбыстрая генерация первичных состояний с переносом заряда P700⁺Chl2B⁻ и P700⁺Chl2A⁻. Реакции переноса электрона в пикосекундном масштабе времени приписывались перераспределению неспаренного электрона между молекулами Chl2A/Chl2B и Chl3A/Chl3B. Спектральная динамика при задержках 0,1–500 пс анализировалась путем разложения на дискретные спектры, связанные с распадом, и непрерывно распределенные экспоненциальные составляющие. Многоэкспоненциальная деконволюция изменений поглощения показала, что реакции переноса электрона в вариантах PsaA-N600M, PsaA-N600H и PsaA-N600L вблизи B-ветви кофакторов аналогичны реакциям дикого типа, тогда как реакции PsaB варианты PsaB-N582M, PsaB-N582H и PsaB-N582L вблизи A-ветви кофакторов вызывают значительные изменения фотохимических процессов, делая их гетерогенными и плохо описываемыми дискретной экспоненциальной кинетической моделью. Было выявлено перераспределение неспаренного электрона между вторым и третьим мономерами Chl2A/Chl2B и Chl3A/Chl3B во временном интервале 1–3 пс, а последующее восстановление A1 во временном диапазоне 24–70 пс. В вариантах PsaA-N600L и PsaB-N582H/L восстановление A1 происходило с уменьшенным квантовым выходом. Уменьшение квантового выхода коррелирует с замедлением восстановления филлохинона A0→A1, но не с начальными переходными спектрами, измененными с наименьшей временной задержкой. Результаты могут быть объяснены в рамках адиабатической модели, в которой P700 электронно связан с симметрично расположенными мономерами Chl2A и Chl2B; такую структуру можно рассматривать как симметричный эксиплекс Chl2APAPBChl2B, в котором возбужденное состояние (Chl2APAPBChl2B)* смешано с двумя состояниями с переносом заряда P700⁺Chl2A⁻ и P700⁺Chl2B⁻. Перераспределение электронов между двумя ветвями в пользу A-ветви, по-видимому, происходит в пикосекундном временном масштабе после восстановления мономеров Chl2A и Chl2B.

Работа была поддержана Российским научным фондом (грант №19-14-00366).

**МЕХАНИЗМЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ АДАПТАЦИИ
ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ОРГАНИЗМОВ К ЭКСТРЕМАЛЬНЫМ
УСЛОВИЯМ ОСВЕЩЕННОСТИ НА УРОВНЕ ФОТОСИСТЕМЫ I**
Molecular mechanisms of adaptation of photosynthetic organisms to the extreme
illumination conditions at the photosystem I level

**Анастасия Петрова^{1*}, Георгий Милановский¹, Дмитрий Черепанов²,
Марина Козулева³, Алексей Семенов¹**

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

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

3 – 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: draparnaldia@gmail.com, тел. +7 (915) 296-79-73

Важнейшими факторами, определяющими жизнедеятельность фотосинтезирующих организмов, являются интенсивность и спектральный состав солнечного света. В настоящее время открыто и охарактеризовано множество видов фотосинтезирующих цианобактерий и микроводорослей, приспособленных к осуществлению фотосинтеза в условиях неоптимальной освещенности. Так, фотосинтетический аппарат цианобактерии *Acaroyochloris marina* приспособлен к использованию света низкоэнергетичного дальнего красного спектрального диапазона, зеленая водоросль *Chlorella ohadii* адаптирована к фотосинтезу в условиях экстремально высокой инсоляции.

Полученные в настоящее время данные о первичных аминокислотных последовательностях фотосинтетических белковых комплексов свидетельствуют о высокой консервативности фотосинтетического аппарата этих экстремофильных организмов, а это значит, что локальные структурные изменения приводят к существенным физиологическим эффектам.

В ходе данной работы были проанализированы особенности кинетики переноса электрона в комплексах ФС I из экстремофильных организмов *A. marina* и *C. ohadii*, а также из модельных организмов – цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 и зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. Кинетические параметры реакций прямого переноса электрона в ФС I были рассчитаны на основе анализа индуцированных лазерной вспышкой кинетик восстановления P700⁺, зарегистрированных для интактных комплексов ФС I, а также для комплексов с удаленными железо-серными кластерами F_A/F_B и F_X, в присутствии возрастающих концентраций акцептора электронов метилвиологена. Применение этого подхода ранее позволило определить константы скорости переноса электрона в комплексах ФС I из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 [1, 2].

Полученные кинетические данные были сопоставлены с особенностями молекулярной организации комплексов ФС I из исследуемых организмов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-14-00366.

1. Petrova et al., *Photosynthesis Research* 133, 175–184 (2017)

2. Milanovsky et al., *Photosynthesis Research* 133, 175–184 (2017)

**МОДЕЛИРОВАНИЕ ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ ВОЗБУЖДЕНИЯ
МЕЖДУ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛОМ И КАРОТИНОИДАМИ В
СВЕТСОБИРАЮЩИХ КОМПЛЕКСАХ ПУРПУРНЫХ БАКТЕРИЙ**
**Simulation of excitation energy transfer between bacteriochlorophyll and carotenoids
in light-harvesting complexes of purple bacteria**

Роман Ю. Пищальников^{1*}, Андрей П. Разживин²

1 – Институт общей физики им. А. М. Прохорова Российской Академии Наук

2 – Научно-исследовательский институт физико-химической биологии
имени А. Н. Белозерского, МГУ имени М. В. Ломоносова

*e-mail: rpishchal@kapella.gpi.ru, тел. +79165187076

Известно, что перенос энергии возбуждения с S_2 уровня каротиноидов (Car) на более низко расположенную полосу Qx бактериохлорофилла (BChl) идет с эффективностью от 20–30% до 100% у разных видов бактерий. Экспериментально нами было показано [1], что переноса энергии возбуждения от перекрывающихся полос Vu, Vx бактериохлорофилла (полоса Core) на S_2 уровень Car нет. Учитывая, что возбужденные состояния полосы Core BChl расположены выше второго синглетного уровня S_2 (Car), необходимо объяснить причины отсутствия переноса энергии возбуждения по пути Vu, Vx $\rightarrow S_2$ (Car). Для теоретического обоснования возможных путей релаксации энергии во взаимодействующей системе бактериохлорофилл-каротиноид, мы оценили энергии взаимодействия между пигментами и возможные характерные релаксационные времена. Обсуждаются причины асимметрии переноса энергии возбуждения между этими пигментами в светособирающих комплексах пурпурных бактерий. Делается вывод об однонаправленном переносе энергии возбуждения Car \rightarrow BChl в фотосинтетическом аппарате бактерий как следствии эволюционного отбора.

Работа была поддержана фондом РФФИ (грант № 19-01-00696)

1. Razjivin A., Gotze J., Lukashev E., Kozlovsky V., Ashikhmin A., Makhneva Z., Moskalenko A., Lokstein H., Paschenko V. J., Lack of Excitation Energy Transfer from the Bacteriochlorophyll Soret Band to Carotenoids in Photosynthetic Complexes of Purple Bacteria. *Phys. Chem. B* (2021), v.125: 3538–3545

**СПИНОВЫЕ ЭФФЕКТЫ НА ПЕРВИЧНЫХ СТАДИЯХ
ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ЭНЕРГИИ СВЕТА**
Spin effects on the primary stages of light energy transformation

Иван Проскуряков

ФИЦ ПНЦБИ, ИФПБ РАН (142290, г. Пушкино, ул. Институтская, 2)

*e-mail: pros@issp.serpukhov.su, тел. +7 496 7732880

Фотореакция переноса электрона в фотосинтетических реакционных центрах (РЦ) и предшествующие ей поглощение света и перенос энергии электронного возбуждения в светособирающих комплексах (ССК) происходят в синглетном ($S = 0$) состоянии пигментных молекул. Тем не менее, спиновые свойства электронов проявляются на первичных стадиях фотосинтеза и служат более глубокому пониманию механизмов этих стадий, а в некоторых случаях связанные с электронными спинами явления представляют также общий физико-химический интерес. Со спиновыми свойствами связаны такие явления, как фотоиндуцированная неравновесная поляризация спиновых подуровней электронов и влияние магнитных полей на динамику и квантовый выход продуктов реакций фотопереноса электрона. В докладе предполагается дать обзор состояний и явлений, возникающих в ходе первичных процессов фотосинтеза:

- спиновая поляризация радикалов первичного донора электронов P^+ и акцептора Q_A^- в бактериальных РЦ;
- свойства сигналов ЭПР первичной ($P^+ \cdot$) и вторичной ($P^+ Q^-$) радикальных пар;
- спин-поляризованные сигналы ЭПР триплетных состояний хлорофильных пигментов и связанная с ними информация о структуре РЦ и механизме их функционирования;
- механизмы тушения триплетных состояний пигментов РЦ и ССК;
- процесс синглет-триплетного деления возбуждения каротиноидов ССК.

Будут также обсуждаться перспективы применения изученных явлений для создания более эффективных искусственных фотоэлектрических преобразователей.

ДЕЛЕНИЕ ВОЗБУЖДЕНИЯ КАРОТИНОИДОВ В СВЕТОСОБИРАЮЩИХ КОМПЛЕКСАХ И МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

Антон Грязнов, Ирина Кленина, Зоя Махнева, Андрей Москаленко,
Иван Проскураков

ИФПБ РАН, Пущино

Интерес к процессу синглет-триплетного деления возбуждения в последние годы значительно возрос, поскольку он может быть применен для повышения эффективности работы фотопреобразователей солнечной энергии [1]. Нами это явление исследовано на примере деления возбуждения молекул каротиноидов (Кар) в светособирающих комплексах (ССК) пурпурных бактерий и в пленках. В этих двух объектах проявляются различные механизмы деления возбуждения. Показано, что в ССК в этом процессе участвуют молекулы бактериохлорофиллов, через которые осуществляется суперобменное взаимодействие, приводящее к делению возбуждения, имеющее межмолекулярный характер [2, 3]. В пленках близкий контакт между молекулами каротиноидов приводит к реализации механизма деления без участия посредников. При этом методом ЭПР впервые зарегистрирован спектр промежуточного состояния дутриплетного комплекса [$^3\text{Кар}^3\text{Кар}$]. Исследование оптических свойств этого состояния сталкивается со значительными трудностями, поскольку они слабо отличаются от свойств изолированных триплетов. Нами также изучены препараты чистого синтетического β -каротина методом ЭПР высокого временного разрешения. Измерения проводили двумя способами – прямой регистрацией спектров ЭПР и измерением кинетических кривых в 50 точках спектра с последующим глобальным анализом данных.

ААГ уведомляет о финансовой поддержке научного проекта РФФИ № 20-33-90024 (Аспиранты).

1. Casillas, R.; Papadopoulos, et al. Molecular insights and concepts to engineer singlet fission energy conversion devices. *Energy & Environ. Sci.*, 2020, vol. 13, p. 2741
2. Кленина И.Б., Махнева З.К., Москаленко А.А., Гудков Н.Д., Большаков М.А., Павлова Е.А., Проскураков И.И., *Биохимия*, 2014, том 79, вып. 3, с. 310 – 317
3. Кленина И.Б., Грязнов А.А., Махнева З.К., Проскураков И.И., *Доклады Академии наук*, 2019, том 485, № 4, с. 511–514

ПЕРВИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ ФОТОСИНТЕЗА И СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ФОТОБИОЛОГИИ Primary processes of photosynthesis and current problems of photobiology

Андрей Рубин

Кафедра биофизики Биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва
*e-mail: rubin@biophys.msu.ru

ВЛИЯНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ВЛАЖНОСТИ ТРЕГАЛОЗНОЙ СТЕКЛОВИДНОЙ МАТРИЦЫ НА ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНА В КОМПЛЕКСАХ ФОТОСИСТЕМЫ 2
Effect of trehalose glassy matrix relative humidity on electron transfer in Photosystem II complexes

Алексей Семенов¹*, Махир Мамедов¹, Георгий Милановский¹, Джованни Вентуроли²

1 – НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия

2 – Университет г. Болонья, Болонья, Италия

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

Исследование белков, включенных в высушенные стекловидные трегалозные матрицы, является важным подходом для исследования тесной связи между конформационной подвижностью и функцией белков. Ранее было изучено влияние высушивания в трегалозной матрице на перенос электрона в бактериальных фотосинтетических реакционных центрах (БРЦ). Было показано, что включение БРЦ в трегалозные матрицы влияет как на прямой перенос электронов от первичного Q_A^- к вторичному хинонному акцептору Q_B , так и на кинетику рекомбинации заряда между Q_A^- – и первичным донором электрона P_{870}^+ [1]. Аналогичное исследование было проведено на значительно более сложном пигмент-белковом комплексе фотосистеме (ФС) 1. Было обнаружено, что последовательная дегидратация матрицы приводит к прекращению прямого переноса электронов от филлохинонов A_{1A} и A_{1B} на 4Fe4S кластеры [2]. Кинетика индуцированного вспышкой восстановления фотоокисленного первичного донора электронов ФС 2 – P_{680} была изучена в растворе и в стекловидных матрицах трегалозы при различной влажности. В растворе в кинетике преобладали две быстрые компоненты со временами жизни в диапазоне 2–7 мкс (85% общей амплитуды сигнала). Эти компоненты были приписаны прямому переносу электронов от редокс-активного тирозина Y_Z к фотоокисленному P_{680}^+ . Более медленные минорные компоненты были обусловлены рекомбинацией заряда между первичным пластохинонным акцептором Q_A^- и P_{680}^+ . Высушивание комплекса ФС 2 в стекловидной трегалозной матрице и ее последовательная дегидратация приводили к замедлению всех кинетических компонент и увеличению относительных амплитуд более медленных компонент за счет более быстрых. При относительной влажности 63% доля быстрых компонент снижалась до ~50%. Дальнейшая дегидратация трегалозной матрицы не приводила к существенным изменениям. Этот эффект был объяснен снижением конформационной подвижности белкового домена между тирозином Y_Z и P_{680}^+ , что приводило к ингибированию переноса электронов $Y_Z \rightarrow P_{680}^+$ примерно в половине комплексов ФС 2, при этом в другой половине ФС 2 наблюдалась рекомбинация между Q_A^- и P_{680}^+ . Ограничение динамики белка в трегалозных матрицах и связанное с ним замедление переноса электронов, являются общей особенностью всех трех типов фотосинтетических реакционных центров, а именно и ФС 2. Однако максимальный эффект трегалозной матрицы в случае ФС 2 наблюдается при более высоких молярных отношениях вода/трегалоза по сравнению с БРЦ и ФС 1. Это согласуется с кристаллографическими данными, которые показывают большее количество молекул воды в ФС 2 по сравнению с ФС 1 и БРЦ.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-14-00366.

1. A. Savitsky, et al., *J. Phys. Chem. B*, 114 (2010) 12729-12743

2. M. Malferrari, et al, *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics*, 1857 (2016) 1440-1454

ВЛИЯНИЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНО ВОССТАНОВЛЕННОГО ХИНОНА Q_A НА ТЕМПЕРАТУРНОЕ ЗАСЕЛЕНИЕ СОСТОЯНИЯ $P^+B_A^-$ В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ ПУРПУРНОЙ БАКТЕРИИ *RHODOBACTER SPHAEROIDES*
Effect of pre-reduced quinone Q_A on the $P^+B_A^-$ temperature activation in the reaction centers of purple bacteria *Rhodobacter sphaeroides*

Антон Христин^{*}, Татьяна Фуфина, Людмила Васильева, Равиль Хатыпов

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

*e-mail: anmaster84@ya.ru

В реакционных центрах (РЦ) фотосинтезирующей бактерии *Rhodobacter sphaeroides* при физиологических условиях возбужденный донор P^* отдает электрон на первичный акцептор B_A с константой времени ~ 3 пс, затем на вторичный акцептор H_A с константой времени $\sim 0,9$ пс и далее на хинонный акцептор Q_A за ~ 200 пс. В настоящее время принято, что разделение зарядов в РЦ происходит согласно последовательной модели прямых реакций: $P^* \rightarrow P^+B_A^- \rightarrow P^+H_A^- \rightarrow P^+Q_A^-$. Однако существует ряд предположений, что в эту цепь реакций существенный вклад вносят реакции обратного переноса. Результаты глобального анализа экспериментальных данных показывают, что для модели прямых реакций концентрационная кривая состояния с разделенными зарядами $P^+B_A^-$ затухает в течение десятков пикосекунд, а для модели реакции с обратимостью – до сотен пикосекунд. Поскольку поглощение анион-радикала B_A^- проявляется в дифференциальных спектрах в виде минорной полосы при 1020 нм, обнаружение которой представляет экспериментально трудную задачу, то для исследования начальной стадии разделения зарядов используют предварительное восстановление хинонного акцептора Q_A , при котором блокируется перенос электрона от H_A на Q_A . В данной работе мы исследовали начальные стадии разделения зарядов в РЦ, в которых хинонный акцептор Q_A находится в нейтральном состоянии (открытые РЦ), и в условиях с предварительно восстановленным хиноном Q_A с помощью дитионита натрия (закрытые РЦ). Для выяснения вклада обратных реакций в начальные стадии разделения зарядов мы измерили собственную кинетику минорной полосы поглощения анион-радикала B_A^- при 1020 нм. В открытых РЦ кинетика полосы поглощения при 1020 нм достигает максимума на задержке времени $\sim 1,7$ пс и спадает в течение ~ 15 пс. Эта кинетика согласно решению системы дифференциальных уравнений для последовательной модели переноса электрона удовлетворительно описывается разностью экспонент с константами времени ~ 3 пс и $\sim 0,8$ пс. Это согласуется с переносом электрона от возбужденного первичного донора на молекулу B_A с константой времени 3 пс и далее на молекулу H_A с константой времени 0,8 пс. В закрытых РЦ кинетическая кривая достигает максимума на той же задержке времени, но ее амплитуда в максимуме увеличивается в два раза. Затухание этой кинетики происходит в течение сотен пикосекунд, как для модели с обратимостью. Одно из возможных объяснений такого увеличения амплитуды и времени затухания кинетики состоит в том, что в закрытых РЦ восстановленный хинонный акцептор Q_A^- повышает уровень энергии состояния $P^+H_A^-$ и приближает его к положению уровня энергии состояния $P^+B_A^-$. Мы предположили, что в закрытых РЦ происходит температурное заселение состояния $P^+B_A^-$ из состояния $P^+H_A^-$. Воспользовавшись распределением Больцмана мы вычислили энергетический зазор между состояниями $P^+B_A^-$ и $P^+H_A^- \sim 23$ мэВ, а это составляет величину, близкую к описанной в литературе (21–25 мэВ). Таким образом, в закрытых РЦ разность энергии между состояниями с разделенными зарядами $P^+B_A^-$ и $P^+H_A^-$ близка к величине kT при комнатной температуре. Это приводит к термодинамическому заселению состояния $P^+B_A^-$, которое дезактивируется в результате рекомбинации зарядов на субнаносекундной шкале времени.

**НЕФОТОХИМИЧЕСКОЕ ТУШЕНИЕ ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ
ХЛОРОФИЛЛА У ЗЕЛеной ВОДОРОСЛИ *HAEMATOCOCCUS LACUSTRIS***
Non-photochemical quenching of the excited chlorophyll states in the green microalga
Haematococcus lacustris

К. А. Чеканов

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

*e-mail: chekanov@mail.bio.msu.ru

Зеленая миводоросль *Haematococcus lacustris* имеет большое практическое значение как продуцент каротиноида астаксантина. Ее культивируют в промышленных масштабах для получения этого пигмента. Синтез каротиноида является защитной реакцией клетки, запускаемой в хлоропласте наряду с прочими протекторными механизмами [1].

Нефотохимическое тушение возбужденных состояний хлорофилла является одним из основных защитных механизмов фототрофов. Оно заключается в рассеивании в виде тепла той доли поглощенной световой энергии, которую клетка не может утилизировать [2]. Одной из мер оценки интенсивности протекания процессов нефотохимического тушения является параметр NPQ Штерна-Фольмера [2]. Ранее установлено, что параметр NPQ снижается при продувании культуры *H. lacustris* газо-воздушной смесью с повышенным содержанием CO₂ [3]. То есть, снижается интенсивность процессов регулируемой диссипации. Известно, что при действии яркого света кинетика NPQ имеет двухфазный характер. Сначала наблюдается монотонный рост параметра, а потом – его значения падают до нуля, то есть при длительном воздействии стрессовых факторов защита клетки осуществляется при помощи механизмов, отличных от нефотохимического тушения [3].

В работе изучали эффективность фотохимической утилизации в реакционных центрах фотосистем в зависимости от интенсивности действующего на клетки *H. lacustris* света. Исследования проводили путем анализа кинетики флуоресценции хлорофилла *a*. В целом, на ранних этапах стрессового воздействия клетки *H. lacustris* характеризовались более высокими значениями NPQ и более медленной темновой релаксацией данного параметра. Добавление нигерцина приводило к снижению параметра NPQ, однако у клеток в состоянии стресса этот эффект был выражен меньше. Методом RNA-seq определено, что на начальных этапах действия стрессовых факторов высокие значения NPQ поддерживались преимущественно за счет экспрессии белков PsbS и LhcsR. Затем стрессоустойчивость достигалась за счет оптического экранирования астаксантином и редукции фотосинтетического аппарата. По-видимому, редукция фотосинтетического аппарата играет ключевую роль для выживания *H. lacustris* при сильном стрессовом воздействии. В отличие от многих микроводорослей, важную роль в клетках *H. lacustris*, играет экранирование, тогда как регулируемое нефотохимическое тушение подавляется. Суть экранирования заключается в том, что астаксантин не связан с фотосинтетическим аппаратом, следовательно, поглощенная им энергия света не передается на реакционные центры, рассеивается в виде тепла. Это позволяет *H. lacustris* какое-то время поддерживать фотосинтетическую активность в условиях стресса и быстро переходить в метаболически активное состояние при возвращении в условия, благоприятные для роста. Способность *H. lacustris* заменять «классические» активные фотозащитные механизмы, такие как регулируемая тепловая диссипация, оптическим экранированием и замедлением метаболизма, делает этот организм интересной моделью для изучения механизмов защиты фотосинтезирующей клетки от неблагоприятных факторов внешней среды.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского Научного Фонда (грант РНФ № 20-74-10028).

1. Boussiba, S., *Physiologia Plantarum*, 2000, 108, 2, 111–117
2. Lazár, D., *Journal of plant physiology*, 2015, 175, 131–147
3. Chekanov, K., Schastnaya, E., Solovchenko, A., Lobakova, E., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2017, 171, 58–66

**УЧАСТИЕ ДЛИННОВОЛНОВЫХ ФОРМ ХЛОРОФИЛЛОВ *D* И *F* В
ПЕРВИЧНЫХ РЕАКЦИЯХ ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ И РАЗДЕЛЕНИЯ
ЗАРЯДОВ В ФОТОСИСТЕМЕ I ЦИАНОБАКТЕРИЙ**
Participation of long-wavelength forms of chlorophylls *d* and *f* in primary reactions of
energy transfer and charge separation in photosystem I of cyanobacteria

**Dmitry Cherepanov^{1*}, Ivan Shelaev¹, Anastasia Petrova², Donald Bryant³,
John Golbeck³, Alexey Semenov^{1,2}**

1 – N. N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Russia

2 – A. N. Belozersky Institute of Physical-Chemical Biology, Moscow State University, Russia

3 – The Pennsylvania State University, State College, PA, USA

*e-mail: tscherepanov@gmail.com, тел. +7 499 1376676

Photosystem I (PSI) of many cyanobacteria comprises ~96 chlorophyll (Chl) molecules, including six specialized Chls denoted *Chl1A/Chl1B* (P₇₀₀), *Chl2A/Chl2B*, and *Chl3A/Chl3B* that are arranged in two branches and function in primary charge separation. Recently, structures of PSI from *Fischerella thermalis* and *Acaryochloris marina* containing Chl *f* [1] and Chl *d* [2], correspondingly, were published. We tested the energy and charge transfer processes in PSI isolated from *A. marina* and from white-light grown (WL-PSI) and far-red light grown (FRL-PSI) *F. thermalis* PCC 7521 by ultrafast pump-probe spectroscopy. The transient spectra were quantified by decomposition into discrete decay-associated spectra, continuously distributed exponential components, and principal components of the singular value decomposition.

The excitation energy transfer (EET) from the antenna to the reaction center (RC) and the primary charge separation within the RC of the WL-PSI from *F. thermalis* PCC 7521 takes place at the time of 12 ps. The energy levels of the excited RC [P₇₀₀⁺A₀⁻]* and the primary ion-radical pair [P₇₀₀⁺A₀⁻] were determined by kinetic analysis, they match each other with a high precision of few meV. The rate constant of the secondary electron transfer A₀→A₁ was estimated as 75 ns⁻¹. The excitation energy transfer from Chl *a* to Chl *f* in the antenna of FRL-PSI from *F. thermalis* PCC 7521 proceeds within 2–3 ps, and the subsequent excitation migration to the RC and formation of the final P₇₀₀⁺A₁⁻ state takes place at 150–200 ps. The slowing compared to WL-PSI is a consequence of several opposing factors: a decrease in the forward EET rate constant from 92 to 22 ns⁻¹, an increase of the backward rate constant from 120 to 181 ns⁻¹, and an increase of the rate constant of the secondary electron transfer A₀→A₁ from 75 to 123 ns⁻¹. The changes of the EET rates are in accordance with the excitation energy level of Chl *f* substituted for Chl *a* in the light harvesting antenna, and the increase of the rate constant of the electron transfer A₀→A₁ was explained by changes in the FRL-PSI structure [3]. We report also the presence of an excitonically coupled homo- or heterodimer of Chl *f* absorbing around 790 nm that is kinetically independent of the Chl *f* population which absorbs around 740 nm.

The PSI from *A. marina* includes Chl *d* in the position Chl2A/Chl2B, which functions as the primary electron acceptor: the primary charge separation proceeds at the time of 5 ps, and the rate constant of secondary electron transfer A₀→A₁ is ~60 ns⁻¹.

This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant RSF 21-74-10085)

1. Hamaguchi, et al., (2021). Structure of the far-red light utilizing photosystem I of *Acaryochloris marina*. *Nature communications*, 12(1), 1–10.
2. Gisriel, et al., (2020). The structure of Photosystem I acclimated to far-red light illuminates an ecologically important acclimation process in photosynthesis. *Science advances*, 6(6), eaay6415.
3. Cherepanov et al., (2020). Evidence that chlorophyll *f* functions solely as an antenna pigment in far-red-light photosystem I from *Fischerella thermalis* PCC 7521. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1861(5–6), 148184.

СЕКЦИЯ 2. РЕГУЛЯЦИЯ ФОТОСИНТЕЗА

РОЛЬ ХЛОРОФИЛЛА *b* В РЕТРОГРАДНОМ СИГНАЛИНГЕ Chlorophyll *b* in retrograde signaling

Ольга Войцеховская

Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург
*e-mail: ovoitse@binran.ru

Специфичный хлорофилл антенных комплексов высших растений, хлорофилл *b* (Хлб), на низком свете усиливает светосбор, а на высоком свете способствует диссипации избытка поглощенной световой энергии; он участвует в формировании «тропинок» для миграции световой энергии в пределах антенны и от антенны к фотосистемам, а также входит непосредственно в состав центров тепловой диссипации (например, в антенном белке Lhcb4). Связывание Хлб белками антенны важно для правильной сборки антенных комплексов, поддержания стэкинга гранальных тилакоидов и оптимальной супрамолекулярной организации фотосинтетических мембран. Недостаток Хлб вызывает изменения состава и размера фотосинтетических комплексов, что приводит к изменению характера их упаковки в мембране и может серьезно лимитировать процессы репарации пигмент-белковых комплексов и линейный электронный транспорт [1,2]. Однако, наиболее удивительной функцией Хлб оказалось его влияние на онтогенетический сигналинг на уровне целого растения, то есть за пределами хлоропластов и фотосинтезирующих клеток листа, что, в частности, хорошо иллюстрирует пример мутантов *staygreen* [3].

У мутантов *chlorina* с нарушениями биосинтеза Хлб снижено содержание фотосинтетических пигментов, усилено образование активных форм кислорода (АФК) в хлоропластах, а также замедлены рост и переход к цветению. Ключевым механизмом, вызывающим повышение продукции АФК, выступает хроническое перевосстановление пула пластохинона, вызванное затруднениями латеральной диффузии в гранальных мембранах [2]. Оказалось также, что (1) мутанты имеют фенотип *gun* (genome-uncoupled: передача ретроградных сигналов нарушена); (2) у мутантов на всех стадиях онтогенеза изменена экспрессия генов, кодирующих фитохромы и криптохромы; (3) мутанты *chlorina* ячменя на ярком свете имеют фенотип «синдрома избегания тени»: низкий иммунитет, сильный рост в длину, отсутствие кушения и другие типичные «поведенческие» эффекты. Обработка растений ячменя дикого типа ингибиторами, имитирующими влияние мутации *chlorina* на фотосинтетический аппарат, а также модуляторами ретроградного сигналинга, изменяла экспрессию фитохромных генов. Эти данные впервые показывают, что восприятие фоторецепторами информации модулируется пластидными сигналами на уровне транскрипции генов фоторецепторов.

Также в листьях растений с различным содержанием Хлб – мутантов *chlorina* и растений-сверхнакопителей Хлб – изменена регуляция плазмодесм, и это не связано с такими факторами как АФК или тиоредоксины [4]. Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что в зависимости от содержания Хлб в составе светособирающей антенны изменяется генерация хлоропластами ретроградных сигналов, которые оказывают влияние на все стороны жизни растения. Этот факт может объяснить удивительную стабильность именно Хлб как «вспомогательного» специфичного для антенны хлорофилла на протяжении всей эволюции высших наземных растений.

Работа поддержана РФФИ (№14-16-00120, №14-16-00120-П) и РФФИ (№18-34-00821).

1. Voitsekhovskaja O.V., Tyutereva E.V., *J Plant Physiol*, 2015, 189, 51–64
2. Tyutereva E.V., Evkaikina A.I., Ivanova A.N. et al., *Photosynth Res*, 2017, 133, 357–70
3. Sakuraba Y., Balazadeh S., Tanaka R. et al., *Plant Cell Physiol*, 2012, 53, 505–17
4. Dmitrieva V.A., Domashkina V.V., Ivanova A.N. et al., *J. Exp. Bot.* 2021

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ГРАДИЕНТА ПРОТОНОВ НА ТИЛАКОИДНОЙ МЕМБАНЕ У ПРОРОСТКОВ ЯЧМЕНЯ, ВЫРАЩЕННЫХ НА СВЕТУ РАЗЛИЧНОГО СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА Formation of transthylakoid electrochemical proton gradient in barley seedlings grown with lighting of different spectrum

Ольга Аверчева*, София Шалюхина, Елизавета Бассарская, Галина Кочетова, Татьяна Жигалова

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра физиологии растений
*e-mail: olga.avercheva@gmail.com, тел. +7 916 1383830

Красный и синий свет наиболее важны для формирования и работы фотосинтетического аппарата [1, 2]. Ранее нами было показано, что выращивание проростков ячменя (*Hordeum vulgare* L.) на синем свете (СС, синие светодиоды, максимум испускания 450 нм) приводит к существенным различиям в показателе NPQ по сравнению с растениями, выращенными на красном свете (КС, красные светодиоды, максимум испускания 660 нм) и контролем (выращенным при освещении белыми люминесцентными лампами, БС). У СС-растений, адаптированных к темноте, иная кинетика индукции NPQ по сравнению с контролем и КС-растениями, а величина NPQ спустя 6 минут после включения света выше на 70%. Чтобы определить причины обнаруженных различий, мы исследовали кинетику формирования электрохимического градиента протонов ($\Delta\mu\text{H}^+$) на тилакоидной мембране и его электрической ($\Delta\psi$) и концентрационной (ΔpH) составляющих у 9-дневных проростков ячменя, выращенных при таком же освещении. Растения выращивали при уровне освещенности 70 мкмоль/(м² с) фотонов фотосинтетически активной радиации, фотопериод – 16/8 часов. Относительную величину $\Delta\mu\text{H}^+$, $\Delta\psi$ и ΔpH определяли методом регистрации электрохромного сдвига на первом листе проростков при помощи модуля P515/P535 для Dual-PAM-100. Перед измерением растения адаптировали к темноте в течение 30–90 мин, затем включали свет и выключали его спустя 30 с, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 мин. Относительные величины $\Delta\mu\text{H}^+$, $\Delta\psi$ и ΔpH рассчитывали из полученных кривых [3].

У контрольных растений измеренный уровень $\Delta\mu\text{H}^+$ был максимальным через 30 с после включения света, далее монотонно снижался и достигал стационарного значения спустя 2 мин после включения света. Эти изменения происходили за счет компонента $\Delta\psi$. При этом компонент ΔpH имел постоянную величину во всех исследованных временных точках. У растений, выращенных на КС, кинетика формирования $\Delta\mu\text{H}^+$ и его компонентов не отличалась от контроля. У растений, выращенных на СС, компонент $\Delta\psi$ достигал стационарного значения чуть позже, чем в контроле – через 3 мин, в остальном же отличий от контроля у этого варианта также не было. Величины $\Delta\mu\text{H}^+$ и его компонентов не отличались достоверно у КС- и СС-растений по сравнению с контролем.

Результаты работы не выявили соответствия между кинетикой генерации протонного градиента на мембранах хлоропластов и кинетикой развития NPQ в растениях исследуемых световых вариантов. По всей видимости, источник различий нужно искать в энергонезависимых компонентах NPQ.

Исследование выполнено с использованием ресурсов ЦКП «Фенотипирование фототрофных организмов» и при поддержке ПНР МГУ (контракт 0850-44-2020).

1. McCree, K.J. (1972). The action spectrum, absorptance and quantum yield of photosynthesis in crop plants. *Agric. Meteorol.*, 9, 191–216
2. Lichtenthaler, H. K., & Burkart, S. (1999). Photosynthesis and High Light Stress. *Bulg. J. Plant Physiol.*, 25(3–4), 3–16
3. Schreiber, U., & Klughammer, C. (2008). New accessory for the DUAL-PAM-100: The P515/535 module and examples of its application. *PAM application notes*, 1, 1–10

**Na⁺-ТРАНСЛОЦИРУЮЩАЯ ФЕРРЕДОКСИН:NAD⁺-ОКСИДОРЕДУКТАЗА
ЯВЛЯЕТСЯ КОМПОНЕНТОМ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ ЭЛЕКТРОН-
ТРАНСПОРТНОЙ ЦЕПИ ЗЕЛЕННЫХ СЕРНЫХ БАКТЕРИЙ**
**Na⁺-translocating ferredoxin:NAD⁺-oxidoreductase is a component of photosynthetic
electron transport chain in green sulfur bacteria**

Александр Богачев*, Юлия Берцова, Махир Мамедов

НИИ Физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского МГУ
*e-mail: bogachev@belozersky.msu.ru, тел. +7 495 9300086

Проведенный поиск *rnf*-генов, кодирующих Na⁺-транслоцирующую ферредоксин:NAD⁺-оксидоредуктазу (RNF), у фотоавтотрофных организмов с фотосинтетическими реакционными центрами типа I показал, что эти гены отсутствуют у гелиобактерий, цианобактерий и растений, но присутствуют в геномах многих, прежде всего морских, зеленых серных бактерий. Анализ экспрессии *rnf*-генов выявил относительно высокий уровень содержания транскриптов этих генов в препаратах РНК, выделенных из морской зеленой серной бактерии *Chlorobium phaeovibrioides*. Установлено, что в мембранной фракции из этой бактерии детектируется Na⁺-зависимая флаводоксин:NAD⁺-оксидоредуктазная активность, отсутствующая в мембранной фракции близкородственной *Chl. phaeovibrioides* пресноводной зеленой серной бактерии *Chlorobaculum limnaeum*, чей геном не содержит *rnf*-генов. Также показано, что освещение мембран *Chl. phaeovibrioides*, но не *Chlorobaculum limnaeum*, приводит к светоиндуцированному восстановлению NAD⁺. Полученные данные позволяют заключить, что RNF может принимать участие в процессе восстановления NAD⁺ у некоторых зеленых серных бактерий, что должно повышать эффективность преобразования энергии света у этих микроорганизмов и является первым примером использования Na⁺-энергетики в фотосинтетических электрон-транспортных цепях [1, 2].

Работа была поддержана фондом РФФ (грант № 19-14-00063)

1. Bertsova Y.V., Kulik L.V., Mamedov M.D., Baykov A.A., Bogachev A.V. (2019) Flavodoxin with an air-stable flavin semiquinone in a green sulfur bacterium. *Photosynth Res.* 142:127–136
2. Bertsova Y.V., Mamedov M.D., Bogachev A.V. (2019) Na⁺-translocating ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase is a component of photosynthetic electron transport chain in green sulfur bacteria. *Biochemistry (Moscow)*, 84:1403–1410

**МЕХАНИЗМ УЧАСТИЯ ПУЛА ПЛАСТОКИНОНА ХЛОРОПЛАСТОВ В РЕТРОГРАДНОЙ
СИГНАЛИЗАЦИИ В ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ КЛЕТКАХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ**
**Mechanism of involvement of the chloroplast plastoquinone pool in retrograde
signaling in photosynthesizing higher plant cells**

**Мария Борисова-Мубаракшина*, Дарья Ветошкина, Марина Козулева,
Илья Найдов, Наталья Руденко, Татьяна Федорчук, 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: +7-496-737-327-15

В настоящее время одним из важных направлений фотобиологии является изучение молекулярных механизмов передачи сигнала от электрон-транспортной цепи фотосинтетического аппарата другим компартментам клетки, в частности ядру, т.н. ретроградная сигнализация. В регуляции экспрессии ядерных генов в ретроградной сигнализации участвуют фитохромы, гормоны (абсцизовая, салициловая, жасмоновая кислоты), МАПК-киназы (митоген-активируемые протеинкиназы), тиоредоксин, Ca²⁺, оксид азота и др. Носителями сигнала, первичными или вторичными, могут быть активные формы кислорода, в частности пероксид водорода (H₂O₂), которые долгое время рассматривали только как деструктивные агенты. Нами показано, что молекулы H₂O₂, образующиеся внутри хлоропласта, диффундируют за пределы хлоропласта, причем количество H₂O₂, вышедшего из хлоропластов, зависит от интенсивности света и времени освещения, а также активности антиоксидантной системы хлоропластов [1]. Диффузия H₂O₂ из хлоропластов осуществляется через аквапорины, расположенные во внутренней хлоропластной мембране, открытие которых может зависеть от активности карбоангидраз(ы) мембранной оболочки хлоропластов.

Известно, что посредством ретроградной сигнализации изменение окислительно-восстановительного состояния пула пластохинона (ПХ пул) хлоропластов влияет на экспрессию ядерных генов белков внешнего пигмент-белкового светособирающего антенного комплекса фотосистемы 2 (ССК 2), приводящую к изменению содержания этих белков и, как следствие, к изменению размера антенны фотосистемы 2 [2]. Молекулярный носитель сигнала о состоянии ПХ пула долгое время оставался невыясненным. В нашей работе экспериментально доказано, что не окислительно-восстановительное состояние ПХ пула само по себе, а количество H₂O₂, образованного в фотосинтезирующих клетках, играет определяющую роль в регуляции размера ССК 2 [3]. Нами исследованы молекулярные механизмы участия ПХ пула в образовании H₂O₂ за счет протекания реакции между пластогидрохиноном и супероксидным анион-радикалом [4], и предположено, что именно такие молекулы H₂O₂ выполняют роль сигнальных агентов в регуляции размера антенны фотосистемы 2.

Работа была поддержана Российским научным фондом (грант № 17-14-01371)

1. M.M. Borisova-Mubarakshina, M.A. Kozuleva, N.N. Rudenko, I.A. Naydov, I.B. Klenina, B.N. Ivanov // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. Vol. 1817. P. 1314–1321
2. D.H. Yang, B. Andersson, E. M. Aro, I. Ohad // *Phot. Res.* 2001. Vol. 68, no. 2. P. 163–174.
3. M.M. Borisova-Mubarakshina, B.N. Ivanov, D.V. Vetoshkina, V.Y. Lubimov, T.P. Fedorchuk, I.A. Naydov, M.A. Kozuleva, N.N. Rudenko, L. Dall'Osto, S. Cazzaniga, R. Bassi // *J. Exp. Botany.* 2015. Vol. 66. P. 7151–7164
4. M.M. Borisova-Mubarakshina, I.A. Naydov, B.N. Ivanov // *FEBS Letters.* 2018. Vol. 592. P. 3221–3228

**ИЗМЕНЕНИЕ РАЗМЕРА СВЕТОСОБИРАЮЩЕЙ АНТЕННЫ
ФС2 – УНИВЕРСАЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ АДАПТАЦИИ
ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ**
The change of the PS2 light-harvesting antenna size – a universal mechanism of
adaptation of the photosynthetic apparatus of higher plants

**Дарья Ветошкина, Илья Найдов, Наталья Руденко, Елена Надеева,
Ирина Позднякова-Филатова, Борис Иванов, Мария Борисова-Мубаракшина**

Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение
Федерального исследовательского центра «Пушкинский научный центр биологических
исследований Российской академии наук», ул. Институтская., д. 2, г. Пушкино,
Московская область, 142290, Россия
*e-mail: vetoshkina_d@mail.ru; тел: +7-977-502-75-90

Уменьшение размера светособирающей антенны фотосистемы 2 (ФС2) при увеличении освещенности является одним из долгосрочных адаптационных механизмов фотосинтетических организмов, инициация которого необходима для уменьшения поглощаемой энергии квантов света и защиты фотосинтетического аппарата от фотоингибирования – повреждений, вызванных действием высокой освещенности. Ранее было показано, что сигналом для запуска этого адаптационного механизма является увеличение количества пероксида водорода в листе, в том числе пероксида водорода, образованного при участии компонентов пула пластохинона (Borisova-Mubarakshina et al., 2015). Несмотря на то, что традиционно процесс регуляции размера антенны ФС2 связывают с действием повышенной освещенности, изменение содержания пероксида водорода в листе, а значит и возникновение сигнала для регуляции размера антенны ФС2, может происходить при действии различных абиотических и биотических стрессовых факторов.

В данной работе было исследовано влияние условий засухи и засоления почвы, а также колонизации корней растений ризосферными бактериями *Pseudomonas putida* BS3701 на содержание пероксида водорода в листьях и размер светособирающей антенны ФС2. Было проанализировано количество светособирающих белков ФС2, а также уровень их экспрессии в контрольных растениях и растениях, подверженных действию выбранных стрессовых факторов. Кроме того, был проанализирован ряд фотосинтетических параметров, рассчитанных на основе изменения флуоресценции хлорофилла *a*.

В результате работы было доказано, что регуляция размера антенны ФС2 является универсальным адаптационным механизмом и происходит как при действии на растения абиотических, так и биотических стрессовых факторов. Изменение размера антенны ФС2 позволяло растениям сохранять показатели фотосинтетической активности, такие как максимальный квантовый выход ФС2 и показатель жизнеспособности, на первых этапах действия выбранных факторов на уровне, соответствующем контрольным растениям.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 17-14-01371).

**ВЛИЯНИЕ ПАТОГЕННОГО ГРИБА *BIPOLARIS SOROKINIANA* НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКУЮ
АКТИВНОСТЬ ПРОРОСТКОВ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ РАЗНОГО ВОЗРАСТА**
Impact of the pathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana* on the photosynthetic activity
of spring barley seedlings of different ages

Т. Н. Виск, Л. Ф. Кабашикова

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси
*e-mail: tania_gavrilenko@mail.ru, тел. +375 (17) 342 28 88

Антропогенное воздействие на окружающую среду и глобальное изменение климата приводит к увеличению инфицированности культурных растений [1]. В этой связи защита растений от фитопатогенов и повышение их устойчивости к болезням является актуальной проблемой современной биологической науки. Фундаментальным фактором контроля ряда важных биологических процессов в ходе развития растений является свет. Появились доказательства его участия в индукции защитных реакций против патогенов [2], что обусловило выяснение роли хлоропластов в контроле иммунных ответов.

Целью данного исследования являлось изучение влияния патогенного гриба *Bipolaris sorokiniana* на фотосинтетическую активность проростков ярового ячменя разного возраста. В качестве объекта исследования были использованы первые листья проростков ярового ячменя сорта Рейдер, выращенных в течение разного времени на водопроводной воде при 22°C на полихроматическом белом свете (120 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹) при 16 ч фотопериоде. В опыте листья ячменя определенного возраста (3-, 7- и 10-дневные) обрабатывали грибом *Bipolaris sorokiniana* путем равномерного опрыскивания проростков водным раствором, содержащим 10⁶ спор/мл. Анализ листьев проводили через 1 и 2 дня после инокуляции патогеном. Контролем служили здоровые проростки ячменя соответствующего возраста. Хлорофилловые пигменты экстрагировали ацетоном и определяли содержание спектрофотометрическим методом на спектрофотометре «Shimadzu, UV-2401PC». Активность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по количеству малонового диальдегида, содержание которого определяли спектрофотометрическим методом по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой. Интенсивность дыхания и фотосинтеза листовой пластинки оценивали по скорости поглощения и выделения O₂ (мкмоль м⁻² с⁻¹), соответственно, используя измерительную систему «PlantVital® 5030 с электрохимическим сенсором кислорода типа «Кларк».

Обнаружено, что инфицирование грибом *Bipolaris sorokiniana* оказывало разное влияние на скорость развития проростков ячменя разного возраста в сравнении с контролем: в молодых проростках ускорялся выход листа из coleoptили и увеличивалась длина последнего почти в 1,4 раза, в зрелых – не отмечено изменений морфологических параметров, а в стареющих – приводило к уменьшению длины первого листа. Инфицирование проростков на всех изученных этапах онтогенеза снижало содержание хлорофилловых пигментов и каротиноидов по сравнению со здоровыми растениями. В молодых и зрелых листьях ячменя при инфицировании отмечено снижение интенсивности дыхания и фотосинтеза по сравнению с контрольными растениями, а в стареющих листьях – усиление интенсивности дыхания на фоне некоторого снижения интенсивности фотосинтеза. Активность ПОЛ, как одного из ключевых показателей устойчивости растений к окислительному стрессу, на всех этапах онтогенеза у инфицированных проростков была ниже по сравнению со здоровыми растениями.

Полученные результаты позволяют сделать заключение о зависимости ответной реакции фотосинтетического аппарата ячменя на инфицирование фитопатогеном от стадии развития растений и являются методической основой для дальнейшего изучения механизмов иммунного ответа с участием хлоропластов.

1. World Food and Agriculture – Statistical pocketbook 2019. Rome: FAO, 2019. 254 p
2. Kangasjarvi et al. // *Journal of Experimental Botany*. 2012. V. 63, No. 4. P. 1619–1636

**РЕГУЛЯЦИЯ ФОТОСИНТЕЗА ЧЕРЕЗ СИМПЛАСТНЫЙ ТРАНСПОРТ:
CROSS-TALK МЕЖДУ ХЛОРОПЛАСТАМИ И ПЛАЗМОДЕСМАМИ**
**Regulation of photosynthesis through symplastic transport: cross-talk between
chloroplasts and plasmodesmata**

**Валерия Дмитриева^{1*}, Валентина Домашкина^{1,2}, Александра Иванова^{1,2},
Владимир Сухов³, Елена Гютерева¹, Ольга Войцеховская^{1†}**

1 – Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург
2 – Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
3 – Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Н. Новгород
*e-mail: VDmitrieva@binran.ru; † ovoitse@binran.ru

Плазмодесмы представляют собой каналы между соседними клетками, обеспечивающие симпластный транспорт различных соединений [1]. В зрелых листьях плазмодесмы между клетками мезофилла выполняют роль транспортного канала для оттока фотоассимилятов во флоэму [2]. Таким образом, плазмодесмы играют важную роль в регуляции фотосинтеза, предотвращая накопление фотоассимилятов в клетках мезофилла и ингибирование фотосинтеза конечным продуктом (feedback inhibition).

Мы исследовали взаимосвязь между функционированием фотосинтетического аппарата и симпластным транспортом в листьях *Arabidopsis*. Известно, что пропускную способность плазмодесм могут регулировать тиоредоксины, АТФ, а также уровни АФК и редокс-статус хлоропластов [3]. Для изучения хлоропластных сигналов, способных регулировать симпластный транспорт ассимилятов, использовали: (1) линии с измененным содержанием хлорофилла *b* – *chl-3* (не синтезирует хлорофилл *b*) и *PhCAO* (сверхнакопитель хлорофилла *b*); (2) линии с нарушением функций тиоредоксинов – *trxm3* (отсутствует пластидный тиоредоксин *m3*) и *ntrc* (отсутствует хлоропластная НАДФН-зависимая тиоредоксин-редуктаза *C*). К освещению добавляли дальний красный свет, который специфично активирует ФС I, таким образом изменяя соотношения АФК, образующихся в фотосинтетическом аппарате, и отношение НАДФН к АТФ. С помощью DUAL-PAM-100 (Walz, Германия) изучали работу ФС I и ФС II, электрохимический градиент (ЭХГ) на тилакоидной мембране и уровни синтеза АТФ. Уровни белка АТФ-синтетазы оценивали методом иммуноблоттинга. С помощью флуоресцентных зондов определяли продукцию $^1\text{O}_2$, H_2O_2 и O_2^- . Пропускную способность плазмодесм оценивали, используя симпластный трэйсер; количество плазмодесм подсчитывали с помощью ТЭМ и иммуногистохимии. Каллозу в плазмодесмах определяли по окраске анилиновым синим; подсчеты проводили с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

Наши исследования показали, что на свету в зрелых, экспортирующих ассимиляты листьях наибольшее влияние на симпластный транспорт оказывают уровни АТФ и НАДФН [4]. Это означает, что роль плазмодесм в регуляции фотосинтеза не сводится к механизму feedback inhibition: плазмодесмы регулируются так, чтобы предотвратить отток ассимилятов и не допустить истощения интермедиатов цикла Кальвина-Бенсона в условиях, когда фотосинтез затруднен. Такая регуляция обеспечивается интенсивным обменом сигналами между хлоропластами и плазмодесмами, а ее механизмом выступает метаболизм каллозы в плазмодесмах. Показано, что функции ФС II и ФС I, а также продукция АФК, зависят от уровня хлорофилла *b* и функциональности тиоредоксинов [4]. Отсутствие хлорофилла *b* приводит к резкому снижению ЭХГ, в особенности ΔΨ, на мембране тилакоидов, что может быть адаптацией к снижению активности ФС II.

Работа поддержана РФФИ (грант №18-34-00821) и РНФ (грант №14-16-00120-П).

1. Burch-Smith T.M., Zambryski P.C., *Current biology*, 2010, 20, 989
2. Turgeon R., Wolf S., *Annu. Rev. Plant Biol.* 2009, 60, 207–21
3. Burch-Smith T.M., Zambryski P.C., *Annu. Rev. Plant Biol.* 2012, 63, 239–260
4. Dmitrieva V.A., Domashkina V.V., Ivanova A.N. et al., *J. Exp. Bot.* 2021

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО
АППАРАТА *HYLOTELEPHIUM TRIPHYLLUM* В ПЕРИОД ИНДУКЦИИ
САМ И ЕЕ РЕГУЛЯЦИЯ В ПРИРОДНЫХ УСЛОВИЯХ**
**Functional activity of *Hylotelephium triphyllum* photosynthetic apparatus during
CAM induction and its regulation in natural conditions**

Тамара Головки, Илья Захожий*, Ольга Дымова

Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, Сыктывкар
*e-mail: zakhozhiy@ib.komisc.ru, тел. +7 912 9605255

В работе представлены результаты изучения механизмов, способствующих сохранению структуры и функций фотосинтетического аппарата, и фотозащитной роли пигмент-белковых комплексов фотосистем очитника трехлистного *Hylotelephium triphyllum* (Нав.) Holub. в период индукции САМ-метаболизма. О переходе растений с C_3 на САМ судили по суточной динамике изменения кислотности клеточного сока, содержания малата и активности ФЕП-карбоксилазы в листьях [1]. Титруемая кислотность возрастала с 15 (днем) до 100 мкмоль[H^+]/г сырой массы (утром) с увеличением содержания малата соответственно с 5 до 35 мкмоль/г сырой массы. Активность ФЕП-карбоксилазы повышалась от 3 до 5 мкмоль НАДН/мг Хл мин. Индукции САМ сопровождалась усилением генерации пероксида водорода [2], снижением содержания хлорофиллов в 1.5 раза, в большей степени за счет потери Хл *a*, и увеличением относительного содержания каротиноидов. Доля пигментов виолаксантинового цикла достигала 40% суммы каротиноидов, а уровень деэпоксидации виолаксантина был максимальным (70–90%) в послеполуденные часы при высокой температуре (свыше 30°C) на полном солнечном свете. Переход с C_3 на САМ тип метаболизма сопровождался изменениями в реализации поглощенной ФС II энергии светового потока в фотохимических процессах и тепловой диссипации. В природных условиях величина максимального квантового выхода ФС II (F_v/F_m) в течение суток варьировала незначительно, тогда как реальный квантовый выход (Φ_{PSII}) к полудню снижался до значений менее 0.1 отн. ед. Падение величины Φ_{PSII} сопровождалось увеличением тепловой диссипации энергии возбуждения (NPQ). Максимальные значения NPQ достигали 5 отн.ед. Анализ данных об индукции нефотохимического тушения ФС II указывает на значительный вклад снижения поглощения света листом в наблюдаемый уровень NPQ [3]. Скорость CO_2 -газообмена в дневные часы была очень низкой. Нетто-поглощение CO_2 возрастало к ночи в 4 раза, от 0.5 до 2 мкмоль/м²с. Величина $\delta^{13}\text{C}$ органического вещества листьев и других органов растений варьировала в пределах от –27.1 до –28.4‰. Обогащение фитомассы *H. triphyllum* легким изотопом углерода свидетельствует о том, что растения в большей мере использовали C_3 тип фотосинтетического метаболизма, чем САМ путь. Это согласуется с данными о динамике роста и накопления биомассы растений. Полученные результаты позволяют заключить, что индукция перехода с C_3 на САМ у факультативного САМ растения очитника трехлистного способствует сохранению фотосинтетического аппарата и реализации репродуктивного потенциала растений, но не вносит существенного вклада в запасание органического вещества. Высокое содержание H_2O_2 (до 100 мкмоль/г сухой массы) согласуется с представлениями о ключевой роли данного метаболита в регуляции перехода на САМ.

Работа выполнена в рамках темы “Физиология и стресс-устойчивость фотосинтеза растений и пойкилогидрических фотоавтотрофов в условиях Севера” (№ АААА-А17-117033010038-7).

1. Головки Т.К., Захожий И.Г., Табаленкова Г.Н. // *Физиология растений*, 2021. Т. 68, №1. С.754–762
2. Силина Е.В., Табаленкова Г.Н., Головки Т.К. // *Физиология растений*, 2021. Т. 68, №4. С. 430–438
3. Птушенко В.В., Птушенко О.С., Самойлова О.П., Соловченко А.Е. // *Биохимия*, 2017. Т. 82, № 1. С. 157–166

ФОТОСИНТЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ХЛОРОПЛАСТОВ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ БИОГЕНЕЗА В ПРОРОСТКАХ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ ПРИ ГЕЛЬМИНТОСПОРИОЗЕ
Photosynthetic activity of chloroplasts at different stages of biogenesis in spring barley seedlings under helminthosporiosis

Л. Ф. Кабашникова, Г. Е. Савченко, Т. Н. Виск

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси

*e-mail: kabashnikova@mail.ru, тел. +375 (17) 342 28 88

Хлоропласты в настоящее время рассматривают как тонко реагирующие на внешние воздействия сенсоры, способные индуцировать высокоспецифичный иммунный ответ к широкому кругу патогенов [1, 2]. Особая роль пластид в иммунитете связана с их участием в биосинтезе ключевых защитных молекул, включая гормоны (салицилат, жасмонат, абсцизовую кислоту) и вторичные мессенджеры, такие как кальций и активные формы кислорода (АФК) [3]. Предполагают, что Ca^{2+} -сигнализация связана с NPQ флуоресценции хлорофилла (Хл), характеризующего тепловую диссипацию световой энергии, и что снижение NPQ может провоцировать накопление в хлоропласте возбужденных электронов и АФК [4], играющих важную роль в генерации иммунного ответа.

Исследована фотосинтетическая активность хлоропластов на разных стадиях биогенеза в проростках ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.), инфицированных грибом *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. Объектами исследований являлись зеленые проростки разного возраста (3–11 дней) и 5-дневные этиолированные проростки, обработанные спорами гриба (10^6 спор/мл). Зеленые проростки анализировали через 2 дня после заражения. Этиолированные проростки после инокуляции выдерживали в темноте в течение 24 ч, а затем выносили на свет (120 мкмоль квантов/м² с) и анализировали через 6 или 24 ч.

Установлено, что инфицирование замедляет накопление Хл и каротиноидов в хлоропластах ячменя в процессе развития в сравнении с физиологическим контролем. В зараженных деэтиолированных листьях наблюдали тенденцию к увеличению содержания Хл *a* и каротиноидов в этиохлоропластах после 6 ч освещения, а после 24 ч скорость накопления пигментов была сопоставима с контролем. Методом РАМ-флуориметрии обнаружено снижение потенциального квантового выхода (Fv/Fm) фотохимических реакций ФС 2 в процессе старения хлоропластов и тенденция к его увеличению при заражении. Коэффициент фотохимического тушения флуоресценции Хл *a* (qP) практически не изменялся в хлоропластах до 9-дневного возраста, но при старении резко снижался в инфицированных листьях. Параметры нефотохимического тушения флуоресценции Хл *a* (NPQ и qN) снижались при старении хлоропластов в здоровых растениях, а при заражении – наоборот, возрастали. В деэтиолированных листьях через 6 ч зеленения параметры Fv/Fm и qP были заметно ниже, чем в зеленых соответствующего возраста, однако значения NPQ и qN оказались соизмеримы, несмотря на более низкое содержание Хл. После 24 ч зеленения параметры Fv/Fm и qP возрастали до уровня зеленых листьев и не изменялись при инфицировании, при этом увеличение содержания Хл не привело к изменению величины NPQ как в контроле, так и при заражении.

Сделано заключение, что структурно-функциональное состояние пластид может быть полезным инструментом для контроля иммунитета растений при селекции и разработке новых технологий защиты растений.

1. Kariola T, Brader G, Li J, Palva E. T. // *The Plant Cell*. 2005. V. 17. P. 282–294
2. Muhlenbock P, Szechynska-Hebda M, Plaszczyca M, Baudo M, Mullineaux P. M., Parker J. E., Karpinska B., Karpinski S. // *The Plant Cell*. 2008. V. 20. P. 2339–2356
3. Serrano I., Audran C., Rivas S. // *J. Exp. Bot.* 2016. V. 67, No. 13. P. 3845–3854
4. Manzoor H., Chiltz A., Madani S., Vatsa P., Schoefs B., Pugin A., Garcia-Brugger A. // *Cell Calcium*. 2012. V. 51. P. 434–444

МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕРАЦИИ СУПЕРОКСИДНОГО РАДИКАЛА В ХЛОРОПЛАСТАХ
Superoxide radical production in chloroplasts

Марина Козулева

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: kozuleva@gmail.com

Повышение содержания O₂ в атмосфере в результате появления кислородного фотосинтеза стало одним из ключевых факторов, определяющим эволюцию фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ФЭТЦ) и фотосистемы I (ФС I) в частности. Одна из реакций кислорода с ФЭТЦ представляет собой одноэлектронное восстановление молекулярного кислорода до супероксидного радикала. В современной ФЭТЦ нет компонентов, которые бы восстанавливали кислород с высокими скоростями в нормальных условиях. Тем не менее, такое восстановление происходит, о чем свидетельствует наличие в хлоропластах мощной антиоксидантной защиты против самого супероксидного радикала и продуктов его дальнейшего восстановления – пероксида водорода и гидроксильного радикала. Более того, контролируемый поток электронов от кофакторов ФС I к O₂ является важным клапаном для высвобождения избытка поглощенной в стрессовых условиях энергии, а стабильный конечный продукт восстановления кислорода, H₂O₂, является важным сигнальным мессенджером.

В докладе рассматриваются основные возможные пути генерации супероксидного радикала при функционировании фотосинтетического аппарата. Работа поддержана грантом РФФИ #17-14-01371п.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ В ЦИТОХРОМНОМ b_6f -КОМПЛЕКСЕ С ПОМОЩЬЮ ИНГИБИТОРА ОКИСЛЕНИЯ ПЛАСТОХИНОЛА 2,4-ДИНИТРОФЕНИЛОВОГО ЭФИРА 2-ЙОДО-4-НИТРОТИМОЛА

Д. В. Вильянен¹, П. Б. Павлов², М. М. Борисова-Мубаракшина¹, И. А. Найдов¹,
Б. Н. Иванов¹, М. А. Козулева^{1*}

1 – Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пушкино
2 – Биотехнологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова
*e-mail: kozuleva@gmail.com

Цитохромный b_6f -комплекс – центральное звено фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ФЭТЦ), для исследования которого широко применяют ингибиторный анализ, в частности для хинол-окисляющего сайта используют такие ингибиторы конкурентного типа как стигмателлин, дибромтимохинон и 2,4-динитрофениловый эфир 2-йодо-4-нитротимола (DNP-INT). Последнее соединение представляется наиболее перспективным для исследования функционирования цитохромного b_6f -комплекса, поскольку DNP-INT не обладает редокс-активностью и для него не показано наличие других сайтов взаимодействия с компонентами ФЭТЦ, помимо хинол-окисляющего сайта цитохромного b_6f -комплекса.

Мы изучили особенности работы DNP-INT на интактных тилакоидах шпината с помощью трех методов (РАМ-флуориметрия, вольтамперометрия и измерение редокс-состояния P_{700}) и обнаружили, что сродство хинол-окисляющего сайта к DNP-INT и, соответственно, ингибиторная активность DNP-INT зависят от условий освещения. При освещении тилакоидов светом высокой интенсивности DNP-INT проявлял себя как мощный ингибитор переноса электронов к ФС1, в то время как при освещении светом низкой интенсивности сродство к нему и его ингибиторная активность были меньше. Используя различные по механизму действия разобщители электронного транспорта (граммицидин D, нигерицин, валиномицин) и варьируя pH среды реакции, мы показали, что ингибиторная активность DNP-INT и сродство к нему сайта окисления пластохинола зависят от величины поглощения протонов тилакоидами. В условиях наличия в среде грамицидина D и низкой интенсивности света зависимость обратной скорости электронного транспорта от концентрации DNP-INT проявляет нелинейный характер, что указывает на то, что DNP-INT в этих условиях является ингибитором с частичным торможением. Однако при исключении из среды реакции грамицидина D или при повышении интенсивности света DNP-INT проявляет себя как ингибитор с полным торможением, что означает, что он связывается с теми же группами b_6f -комплекса, что и субстрат (пластохинол).

Мы предполагаем, что зависимость эффективности ингибиторного действия DNP-INT от условий освещения частично объясняется степенью закисления люмена на свету и протонирования буферных групп тилакоидной мембраны. Наиболее вероятным кандидатом на роль pH-зависимого регулятора сродства сайта к DNP-INT является аминокислотный остаток субъединицы IV b_6f -комплекса Glu78 – аминокислота, через которую осуществляется отрыв второго протона от пластохинола при его окислении в b_6f -комплексе и переносе электрона в низкопотенциальную цепь. На основании полученных данных мы предполагаем, что на свету за счет протонов люмена поддерживается долгоживущее протонированное состояние Glu78, что затрудняет окисление молекулы пластохинола в b_6f -комплексе, и может быть механизмом реализации «фотосинтетического контроля».

Работа поддержана грантом РФФИ №17-14-00371п.

ДИАГНОСТИКА СОДЕРЖАНИЯ ХЛОРОФИЛЛА В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ ЛЬНА В УСЛОВИЯХ СТРЕСС-ФАКТОРА Diagnostics of chlorophyll content in flax plant leaves under stress-factor conditions

Константин Королев

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Тюменский государственный университет»
*e-mail: corolev.konstantin2016@yandex.ru, тел. +7 9829722770

Реакция растений на изменение экологических условий сказывается на прохождении большого жизненного цикла, сезонном ритме развития, характере прохождения и продолжительности отдельных фенофаз [1]. Устойчивость сортов к дефициту почвенной влаги на начальных этапах онтогенеза имеет важное значение для дальнейшего развития растений на засолении [2]. Реакция растений на засоление носит неспецифический характер и аналогична их ответу на действие многочисленных стрессовых факторов. Влияние повышенной концентрации соли приводит к развитию в растениях окислительного стресса вследствие повышения содержания активных форм кислорода [3].

Научно-исследовательская работа выполнена в 2018–2020 гг. в лаборатории биотехнологических и микробиологических исследований. Объекты исследования – сорта льна долгунца и льна масличного из коллекционного фонда Института биологии Тюменского государственного университета. Растения льна выращивали в климатической камере (учетный период – 21 сут, освещенность 5000 лк) в вегетационных сосудах на обычном и провокационном (засуха, засоление) фонах. Засуху создавали путем снижения влажности почвы до 30% от ПВ, засоление – путем добавления в сосуды 0,7%, 1,4%, 2,8% растворов NaCl. Количество семян в каждом сосуде составляло 15 шт. Повторность опытов 4-х кратная. Содержание хлорофилла в листьях растений льна определяли с использованием оптического счетчика хлорофилла Spad-502 Plus (Япония). Статистическая обработка данных осуществляли по методике Г. Ф. Лакина [4]. Достоверность различий между сортами устанавливали с использованием t-критерия Стьюдента.

В результате исследований на основе многофакторного дисперсионного анализа установлено достоверное (при 95,0% уровне значимости) влияние факторов А (генотип), фактора В (среда) на содержание хлорофилла в листьях растений льна при действии засухи и хлоридного засоления. Выявлено, что в контрольных и опытных вариантах у сортов масличной и долгунцовой группы накопление хлорофилла происходит неравномерно. Высокий уровень засоления (2,8% NaCl, лен масличный) привел к максимальному межсортовому полиморфизму среди набора изучаемых генотипов льна.

1. Анищенко Л.В., Шишлова Ж.Н. Биология редких видов лекарственных растений в условиях культуры на Нижнем Дону / Л.В. Анищенко, Ж.Н. Шишлова // Генетические ресурсы лекарственных и ароматических растений. Сб. науч. тр. Междунар. конф., посв. 50-летию ботанического сада ВИЛАР. – Москва, 2001. – С. 90–94
2. Патурицкий А.В., Козулина Н. С. Физиологическая оценка засухоустойчивости селекционного материала пшеницы и ячменя. – Красноярский государственный аграрный ин-т, 1999. – 250 с
3. Гарифзянов А.Р., Жуков Н.Н. АФК-индуцированные процессы в клетках х-Triticosecale в условиях натрий-хлоридного засоления // Изв. ТулГУ. Естественные науки. 2013. Вып. 1. С. 241–250.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – Учеб. пособие для биол. спец. вузов. М.: Высшая школа. – 1990. – 352 с.

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ СТРУКТУРНЫМ ПЕРЕХОДОМ В МАРГАНЦЕВОМ КЛАСТЕРЕ ФОТОСИСТЕМЫ 2 ПРИ pH 5,7 И ЕЕ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ФОТОИНГИБИРОВАНИЮ И ТЕРМОИНАКТИВАЦИИ

The relationship between the structural transition in the manganese cluster of photosystem II at pH 5.7 and its resistance to photoinhibition and thermal inactivation

Лира Давлетшина, Алексей Локтюшкин, Елена Ловягина, Борис Сёмин*

Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
*e-mail: semin@biophys.msu.ru

Катионы марганца кислород-выделяющего комплекса (КВК) фотосистемы 2 (ФС2) практически полностью экстрагируются при восстановлении их гидроксиламином. Для заряженных (катионы железа) и объемных молекул восстановителей (гидрохинон и бензидин) марганцевый кластер недоступен, поскольку закрыт периферическими белками. Удаление периферических белков PsbP и PsbQ открывает кластер, и катионы марганца становятся доступными для восстановителей, однако восстанавливаются они избирательно. При pH 6,5 гидрохинон экстрагирует 3 катиона Mn из 4-х [1], а катионы Fe(II) восстанавливают и экстрагируют только 2 катиона [2]. Исследуя этот процесс, мы обнаружили, что при pH 5,7 устойчивость катионов марганца к действию этих восстановителей повышается: Fe(II) восстанавливает только 1 катион марганца, а гидрохинон – 2 катиона, т.е. протонирование элементов, участвующих в организации марганцевого кластера (лигандов и/или мостиков), приводит к понижению редокс потенциала одного из катионов марганца, и он становится недоступен для восстановителей [1, 2]. Фактически марганцевый кластер в области pH 5,7 становится более резистентным к действию восстановителей, чем при pH 6,5.

Известно, что физиологически важный процесс, происходящий при освещении фотосинтетического аппарата, – фотоингибирование – тесно связан с разрушением марганцевого кластера КВК вследствие появления активных форм кислорода, некоторые из которых являются эффективными восстановителями (O_2^+ и H_2O_2) [3]. В этой связи мы провели сравнительное исследование скорости фотоинактивации ФС2 при pH 6,5 и 5,7 и обнаружили, что устойчивость к фотоинактивации нативных мембранных препаратов ФС2 и ФС2 без периферических белков при pH 5,7 больше, чем при pH 6,5. В тилакоидных мембранах свет генерирует трансмембранный градиент pH, что приводит к подкислению люмена до pH 5,7. Разобщители (NH_4Cl и нигерицин) предотвращают подкисление люмена, при этом скорость фотоинактивации ФС2 возрастает.

Другим не менее важным для растений процессом является термоинактивация фотосинтетического аппарата. Ряд данных указывает на участие в процессе термоинактивации восстановителей (активные формы кислорода) [4]. В этой связи мы исследовали pH зависимость термоинактивации мембранных препаратов ФС2 и также обнаружили повышенную устойчивость ФС2 к действию температуры (50°C) в области pH 5,7 по сравнению с pH 6,5. Мы предполагаем, что структурный переход в КВК при pH 5,7 играет роль встроенного механизма, защищающего ФС2 от фотоингибирования и температурного стресса.

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ №121032500058-7.

1. Semin et al. *Photosynth. Res.* 125:95, 2015
2. Semin et al. *J. Photochem. Photobiol. B* 178:192, 2018
3. Pospíšil. *Biochim. Biophys. Acta* 1817:218, 2012
4. Yamashita et al. *J. Biol. Chem.* 283:28380, 2008

ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ АКТИВНОСТИ ОСНОВНОГО МОДУЛЯТОРА СТРЕССОВЫХ ОТВЕТОВ РАСТЕНИЙ – SnRK1-КИНАЗЫ – НА ФОТОСИНТЕЗ *ARABIDOPSIS THALIANA*
Effect of the levels of the main modulator of plant stress responses, the SnRK1-kinase, on photosynthesis of *Arabidopsis thaliana*

Александра Муртузова*, Ольга Войцеховская, Елена Тютерева

Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург
*e-mail: amurtuzova@binran.com, тел. +7 960 4157406

В процессе фотосинтеза растения преобразуют свет в энергию химических связей, как правило, углеводов, для поддержания своего роста и развития. Сахара являются не только метаболическими субстратами, но и важными сигнальными молекулами. Многочисленные исследования последних лет выявили ключевую роль сахаров в регуляции активности двух киназ – Target Of Rapamycin (TOR) и Sucrose nonfermenting 1-related kinase (SnRK1) – в клетках растений. TOR-киназа активизирует процессы анаболизма в благоприятных условиях. Напротив, SnRK1 активируется в ответ на стресс и на дефицит энергии, способствуя восстановлению энергетического баланса клеток за счет включения катаболических путей, ведущих к продукции АТФ, таких как гликолиз и окисление жирных кислот, параллельно блокируя TOR-зависимые процессы метаболизма и роста, потребляющие АТФ, не существенные для выживания в условиях стресса [1].

SnRK1 является клеточным сенсором энергетического заряда, что позволило предположить возможность ее влияния на работу фотосистем ФС1 и ФС2. В качестве модельных растений были выбраны линии *Arabidopsis thaliana* с разным уровнем экспрессии гена каталитической субъединицы SnRK1-киназы – *KIN10*: линия RNAi с подавлением экспрессии *KIN10* и линия со сверхэкспрессией *KIN10*, и растения дикого типа экотипа LER. Прежде всего была проведена проверка замолкания и высокой экспрессии *KIN10* у трансгенных линий на двух стадиях: у 9-дневных проростков, выращенных на среде MS1, и в листьях взрослых растений, выращенных на почве, с помощью ПЦР РВ. Также были изучены уровни экспрессии гена второй изоформы каталитической субъединицы SnRK1 – *KIN11*. Было подтверждено, что трансгенные линии достоверно различаются по содержанию транскриптов *KIN10*, но не отличаются по экспрессии *KIN11*. Далее показатели газообмена и активности фотосистем были изучены с помощью газоанализатора GFS-3000 и Dual PAM 100 (Walz, Germany) у растений в отсутствие стресса и у растений, подвергавшихся почвенному засолению. Изучали скорость фотосинтетической фиксации CO_2 , скорость транспирации, ОЛР кинетики, параметры переменной флуоресценции хлорофилла *a* и электрохромного сдвига. Впервые показано, что фотосинтетические параметры зависят от содержания SnRK1-киназы в листьях взрослых растений *Arabidopsis*.

Исследование поддержано РФФИ (грант №20-34-90138)

1. Baena-Gonzalez E., Rolland F., Thevelein J.M., Sheen J. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signaling. *Nature*, 448, 938–942 (2007)

ОСОБЕННОСТИ ФОТОСИНТЕЗА РАСТЕНИЙ *ARABIDOPSIS THALIANA* С НОКАУТОМ ТИЛАКОИДНОЙ АЛЬФА-КАРБОАНГИДРАЗЫ 2
Peculiarities of photosynthesis of *Arabidopsis thaliana* plants with knockout of thylakoid alpha-carbonic anhydrase 2

Елена Надеева-Журикова*, Людмила Игнатова, Дарья Ветошкина, Илья Найдов, Марина Козулева, Борис Иванов

Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН

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

Для поддержания протонного градиента важными механизмами являются: регуляция переноса электронов и протонов через тилакоидную мембрану. Мы предполагаем, что одним из белков, регулирующих подкисление люмена может быть альфа-карбоангидраза 2 (альфа-КА2), осуществляющая обратимую гидратацию CO₂.

Эксперименты проводили на растениях *Arabidopsis thaliana* дикого типа (ДТ) и мутантных растениях с нокаутом гена At2g28210, кодирующего альфа-КА2. Растения выращивали с 8-часовым фото периодом при интенсивности света 50 мкмоль квантов/м²с и концентрации CO₂ 400 ppm. Сравнили параметры фотосинтеза мутантных растений с параметрами растений ДТ.

Отсутствие альфа-КА2 сказывается на окислительно-восстановительном состоянии пула пластохинона. Параметр флуоресценции хлорофилла *a* ФС2 1-qL и в первую минуту освещения, и в конце освещения светом высокой интенсивности (530 мкмоль квантов/м²с) в мутанте был ниже, чем в ДТ. Измерение ОЛР-кинетики показало, что, параметр Sm, характеризующий окислительно-восстановительное состояние пула пластохинона, в мутанте был выше, чем в ДТ. Эти данные свидетельствуют о том, что относительный уровень восстановления пула пластохинона в мутанте был ниже, чем в растениях ДТ. Нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a* (qN) при стационарном фотосинтезе в мутанте было выше, чем в ДТ.

Отсутствие альфа-КА2 влияет на содержание протонов в люмене. Были измерены градиент протонов (ΔpH) через тилакоидную мембрану и скорость утечки протонов из люмена в строму в темноте. В мутанте ΔpH был ниже, чем в ДТ в течение всего времени освещения высоким светом, тогда как скорость утечки протонов из люмена в строму в темноте в мутанте была выше, чем в ДТ, в течение всего времени освещения высоким светом.

Измерение низкотемпературной флуоресценции хлорофилла показало, что во время процесса state transition в мутанте по альфа-КА2 только 8% антенны отходит от ФС2 к ФС1, тогда как в ДТ – 23%. Вероятно, в мутанте, по сравнению с ДТ, из-за меньшего содержания протонов в люмене, в меньшей степени активируется STN7 киназа.

Скорость электронного транспорта в тилакоидах, выделенных из мутанта, выше, чем в тилакоидах, выделенных из ДТ. При добавлении к тилакоидам разобщителя в мутанте скорость электронного транспорта увеличивалась в меньшей степени, чем в тилакоидах ДТ. По-видимому, это связано с тем, что в мутанте отсутствие альфа-КА2 вызывает разобщение электронного транспорта, увеличивая его скорость.

Мы предполагаем, что альфа-КА2, располагаясь в гранальной части тилакоидной мембраны, участвует в регуляции pH люмена.

Работа была поддержана фондом РФФ (грант № 17-14-01371)

Пути восполнения пула интермедиатов ЦТК у ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ПУРПУРНЫХ НЕСЕРНЫХ БАКТЕРИЙ
TCA cycle replenishing pathways in photosynthetic purple nonsulfur bacteria

Екатерина Петушкова^{1*}, Екатерина Майорова^{1,2}, Анатолий Цыганков¹

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

2 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пущинский государственный естественно-научный институт», г. Пущино, Московская область, 142290, Россия

*e-mail: peteka2008@gmail.com, тел. +7 (496) 773-27-91

Пурпурные несерные бактерии (ПНСБ) осуществляют анаэробный фотосинтез и способны использовать простые органические кислоты в качестве доноров электронов. ПНСБ являются производителями α-аминолевулиновой кислоты, полигидроксиалканатов, бактериохлорофиллов *a* и *b*, убихинонов и других ценных соединений, а также весьма перспективными производителями молекулярного водорода. Во многих случаях ПНСБ могут использоваться в качестве среды для выращивания сточные воды, например, после ферментации органических отходов. Такие ферментационные жидкости содержат в основном уксусную кислоту. Для клеток, использующих ацетат в качестве единственного органического субстрата, устойчивый функционирующий цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) является жизненно важным. Из-за оттока промежуточных продуктов цикла на биосинтетические процессы должен функционировать механизм, пополняющий пул интермедиатов ЦТК. В настоящее время известны следующие анаэробные пути восполнения пула ЦТК: глиоксилатный цикл, этилмалонил-КоА путь, пируватсинтаза в сочетании с карбоксилирующими ферментами, цитрамалатный цикл, метиласпартатный цикл, а также некоторые автотрофные реакции фиксации CO₂. Пути восполнения ЦТК имеют как общие, так и переменные последовательности реакций, синтез в них промежуточных соединений ЦТК проходит через стадию образования одного из четырех основных метаболитов: глиоксилата, пропионил-КоА, и пирувата/фосфоенолпирувата. Дальнейшие пути их превращения в компоненты ЦТК также переменны.

В рамках данной работы рассмотрены актуальная информация о наличии и разнообразии анаэробных путей у ПНСБ, различные классификации этих путей; представлена дополненная новыми цепочками реакций интегрированная схема путей восполнения ЦТК. В схему включены реакции образования глиоксилата и пирувата/фосфоенолпирувата из глицина в восстановительном глициновом пути, два дополнительных пути превращения глиоксилата (в β-гидроксиаспартатном цикле до оксалоацетата и через часть глицератного пути до пирувата и фосфоенолпирувата). Интегрированная схема может быть использована для быстрого и простого поиска последовательностей реакций, связанных с синтезом интермедиатов ЦТК, при изучении прокариотических организмов.

Работа поддержана РФФ (грант № 19-14-00255).

**РОЛЬ РАЗНЫХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ СВЕТОСБОРА В ЗАЩИТЕ
ОТ СВЕТОВОГО СТРЕССА У РАСТЕНИЙ РОДА *TRADESCANTIA***
The role of different mechanisms of light harvesting regulation in *Tradescantia* genus
plants in the protection against light stress

О. С. Птушенко^{1*}, Г. В. Кочетова¹, В. В. Птушенко^{2,3}

1 – Биологический факультет Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова (МГУ)

2 – НИИ физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского МГУ

3 – Институт биохимической физики имени Н. М. Эмануэля РАН

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

Изменения освещённости, происходящие в естественной среде обитания растений в широких пределах и в самых различных временных диапазонах, требуют соответствующих реакций фотосинтетического аппарата для адаптации к меняющимся условиям. Для высших растений характерен ряд механизмов, позволяющих регулировать эффективность светосбора фотосинтетической антенной и эффективность использования поглощённой энергии света [1]. Нами предложен набор видов рода *Tradescantia* в качестве перспективного ряда модельных объектов для исследований механизмов регуляции и защиты фотосинтетического аппарата от светового стресса. Показано, что для растений этого рода характерны значительные светозависимые изменения оптического пропускания листа (ΔT), играющие регуляторную роль и существенно превосходящие аналогичные изменения у большинства изученных растений. В то же время изменения содержания дезоксидированных форм каротиноидов (зеаксантин, антераксантин), выполняющих защитную функцию в условиях избыточного возбуждения фотосинтетической антенны, относительно невелики и коррелируют с величиной ΔT . При росте на более интенсивном свете у теневыносливого вида *T. fluminensis* возрастают изменения коэффициента дезоксидации, а изменения ΔT снижаются. Светолюбивый вид *T. sillamontana* демонстрирует гораздо меньшую пластичность. Предполагается, что характерная для листа зелёного растения величина ΔT обусловлена его анатомическими характеристиками [2, 3]. В то же время, анатомические характеристики, в какой-то мере связанные с фотосинтезом (размеры клеток мезофилла и хлоропластов, строение устьичного аппарата) также проявляют лишь незначительную пластичность в отношении изменений интенсивности освещения как у светолюбивого, так и у теневыносливого вида.

Работа была поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 19-016-00016)

1. Demmig-Adams, B., Cohu, C. M., Muller, O., & Adams, W. W. (2012). Modulation of photosynthetic energy conversion efficiency in nature: from seconds to seasons. *Photosynthesis Research*, 113(1), 75–88
2. Königer, M., Delamaide, J. A., Marlow, E. D., & Harris, G. C. (2008). Arabidopsis thaliana leaves with altered chloroplast numbers and chloroplast movement exhibit impaired adjustments to both low and high light. *Journal of experimental botany*, 59(9), 2285–2297
3. Davis, P. A., Caylor, S., Whippe, C. W., & Hangarter, R. P. (2011). Changes in leaf optical properties associated with light-dependent chloroplast movements. *Plant, cell & environment*, 34(12), 2047–2059

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ, БРОУНОВСКИЕ, КИНЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ И
МОНТЕ КАРЛО МОДЕЛИ ПРОЦЕССОВ В ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ
МЕМБРАНЕ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ И МИКРОВОДОРОСЛЕЙ**
Molecular, Brownian, kinetic and Monte Carlo models of the processes in
photosynthetic membrane of green plants and microalgae

**Галина Ризниченко^{1*}, Тарас Антал^{1,2}, Наталья Беляева¹,
Александра Дьяконова¹, Илья Коваленко¹, Алексей Маслаков¹,
Татьяна Плюснина¹, Владимир Федоров¹, Сергей Хрушев¹, Андрей Рубин¹**

1 – Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва

2 – Псковский государственный университет, Псков

*e-mail: riznich46@mail.ru; +7 (495) 939-14-02

Представлены результаты выполненных на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова работ по математическому и компьютерному моделированию [1–10]. Детальные кинетические модели процессов в тилакоидной мембране включают перенос электрона в реакционных центрах фотосистем I и II, цитохромном комплексе, линейный и циклический транспорт электронов, описывают роль электрического и электрохимического потенциала, буферных групп, нефотохимическое тушение флуоресценции и регуляцию процессов сопряжения с циклом Кальвина [1, 2]. Модели количественно описывают процессы индукции флуоресценции и редокс превращений P700 на временном интервале от микросекунд до 30 сек. Воспроизводит процессы в ансамблях фотосинтетических цепей, размеры которых соизмеримы с их количеством в клетках микроводорослей позволяют модели, основанные на методе Монте Карло [3, 4]. Для анализа больших массивов экспериментальных данных по индукции флуоресценции разработан метод мультиэкспоненциальной аппроксимации. Метод применен для задач экологического и биотехнологического мониторинга [5–7] и позволяет определять участки ЭТЦ, претерпевающие изменение в ходе роста культуры. С помощью поэтапного броуновского и молекулярного компьютерного моделирования описан процесс формирования функционально активного белок-белкового комплекса фотосинтетических белков цитохрома *f* и пластоцианина в растворе [8]. Выявлены физические механизмы, определяющие различные пути образования комплекса этих белков у высших растений, зеленых водорослей и цианобактерий. Изучена роль электростатических взаимодействий в ходе образования диффузионно-столкновительных комплексов различных видов фотосинтезирующих организмов [8, 9]. Детали проведенных работ будут освещены в докладах участников.

Исследования выполнены в рамках научного проекта государственного задания МГУ №121032500060-0 при частичной поддержке гранта РФФИ № 20-64-46018 и грантов РФФИ № 20-04-00465 и 19-04-00999.

1. Belyaeva NE et al. // *Photosyn Res* 2020. 146:259-278. doi: 10.1007/s11120-020-00774-3
2. Belyaeva NE et al. // *Photosyn Res* 2019, 140:1-19. doi: 10.1007/s11120-019-00627-8
3. Маслаков АС и др. // *Биофизика* 2016, 61(3):464-477. doi: 10.1134/S000635091603009X
4. Antal TK et al. // *Photosyn Res* 2018, 138(2):191-206. doi: 10.1007/s11120-018-0564-2
5. Plyusnina TY et al. // *Photosynthetica* 2020 58(S1):443–451. doi: 10.32615/ps.2020.002
6. Antal TK et al. // *Physiol Plantarum* 2018, 165(3):476-486. doi: 10.1111/ppl.12693
7. Плюснина ТЮ и др. // *Биофизика* 2019, 64(3):468-477. doi: 10.1134/S0006350919030175
8. Fedorov VA et al. // *Physiol Plantarum* 2019, 166(1):320-335. doi: 10.1111/ppl.12940
9. Kovalenko IB et al. // *Physiol Plantarum* 2017, 161(1):88-96. doi: 10.1111/ppl.12570
10. Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Динамические модели электронного транспорта в фотосинтезе. — М.—Ижевск: 2020, 332 с. ISBN 978-5-4344-0866-0

СИНТЕТИЧЕСКИЕ МЕТАЛЛООРГАНИЧЕСКИЕ КОМПЛЕКСЫ НА ОСНОВЕ ДВУХВАЛЕНТНОЙ МЕДИ ИНГИБИРУЮТ ФОТОХИМИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ФОТОСИСТЕМЫ 2 НА УРОВНЕ РЕАКЦИОННОГО ЦЕНТРА
Synthetic organometallic complexes based on bivalent copper inhibit the photochemical activity of photosystem II at the level of the reaction center

Маргарита Родионова^{1*}, Лейла Халилова², Сергей Жармухамедов³, Мехмед Караджан⁴, Нуркан Караджан⁴, Владимир Креславский³, Салех Алвасел⁵, Сулейман Аллахвердиев^{1,2,3,5}

1 – Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

2 – Институт молекулярной биологии и биотехнологии, НАН Азербайджана, Баку, Азербайджан

3 – Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Россия

4 – Университет Гази, Анкара, Турция

5 – Колледж науки, Университет короля Сауда, Эр-Рияд, Саудовская Аравия

*e-mail: rodionovamv5@gmail.com

В качестве важного процесса развития растений фотосинтез является привлекательной мишенью для синтетических соединений, направленных на подавление основных метаболических путей в растениях. Новые синтетические комплексы на основе двухвалентной меди были изучены на предмет ингибирования фотосинтетической активности, связанной с фотосистемой 2 (ФС-2). Было обнаружено, что в присутствии гидрофильного искусственного акцептора электронов феррицианида калия агенты подавляют фотоиндуцированное выделение кислорода тилакоидами в основном на уровне ФС-1. Таким образом, они нарушают перенос электронов от воды по всей цепи переноса электронов (ЭТЦ). Сравнивая влияние Cu(II) комплексов на фотоиндуцированные изменения выхода флуоресценции с действием DCMU, блокирующего перенос электронов в сайте Q_A/Q_B , и DBMIB, нарушающего взаимодействие между фотосистемами в сайте Q_0 цитохромного комплекса Cyt_b/f , было обнаружено, что Cu(II) комплексы влияют на взаимодействие между фотосистемами в гораздо меньшей степени, чем известные ингибиторы. Кроме того, было продемонстрировано, что Cu(II) комплексы ингибируют фотосинтетическое выделение O_2 на уровне ФС-2, и этот эффект почти сопоставим с уменьшением выделения O_2 по всей ЭТЦ. Кроме того, данные соединения уменьшают значение переменной флуоресценции в зависимости от концентрации, но не проявляют каких-либо других эффектов, типичных для DCMU и DBMIB. Поскольку добавление экзогенных доноров электронов не оказывает никакого влияния в присутствии Cu(II) комплексов, можно предположить, что возможный сайт их действия находится на уровне компонентов реакционного центра ФС-2. Следует отметить, что Cu(II) комплексы не вызывают структурных повреждений полипептидов фотосинтетического аппарата и не действуют как тушители возбужденных состояний хлорофилла.

Работа была поддержана Российским научным фондом (грант 19-14-00118). С. Алвасел благодарит Программу стипендиования выдающихся ученых Университета короля Сауда, Саудовская Аравия (Distinguished Scientists Fellowship Program, King Saud University, Saudi Arabia) за финансовую поддержку.

КАРБОНАНГИДРАЗЫ В ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ КЛЕТКАХ *ARABIDOPSIS THALIANA*
Carbonic anhydrases in photosynthesizing cells of *Arabidopsis thaliana*

Наталья Руденко*, Марина Козулева, Татьяна Федорчук, Людмила Игнатова, Елена Надеева-Журикова, Борис Иванов, Мария Борисова-Мубаракшина

Институт фундаментальных проблем биологии РАН Федерального исследовательского центра «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290 Пущино
 *e-mail: nataliacherry413@gmail.com, тел. +7 4967 732448

Карбоангидразы (КА) – ферменты, катализирующие обратимую гидратацию углекислого газа, значительно увеличивая скорость реакции в обоих направлениях. В клетках высших растений присутствуют КА, принадлежащие трем семействам: α , β и γ .

В стромальных тилакоидных мембранах, обогащенных ФС1 и комплексами АТФ-синтазы, и в гранальных тилакоидах, обогащенных ФС2, были обнаружены КА с различными свойствами. Методом масс-спектрометрии в стромальных тилакоидах арабидопсиса показано присутствие α КА5. По-видимому, функционирование этой КА обуславливает обнаруженный много лет назад эффект стимуляции фотофосфорилирования в присутствии бикарбоната. Ещё одна тилакоидная КА, α КА4, расположена вблизи ФС2. Выключение синтеза α КА4 приводило к уменьшению нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла (НФХТ), а также к многочисленным изменениям, по сравнению с растениями дикого типа (ДТ), метаболизма мутантных растений, в частности, к увеличению содержания крахмала и пероксида водорода в листьях мутантов, а также к уменьшению размеров светособирающей антенны ФС2.

Наши исследования свидетельствуют в пользу того, что в тилакоидной мембране расположена α КА2. Нокаутирование гена *aka2* приводило к эффектам, противоположным тем, что наблюдались в мутантах по α КА4. Эти две КА, функционируя «в паре», могут принимать участие в регуляции энергозависимого НФХТ, связанного с протонированием белка PsbS.

В люмене тилакоидов арабидопсиса обнаружено присутствие высокомолекулярной растворимой КА β -семейства, идентифицированной нами масс-спектрометрически как продукт гена, кодирующего β КА5.

Наши исследования показали, что функционирование α КА1, обнаруженной в строме хлоропластов *Arabidopsis thaliana*, сопряжено реакциями фотосинтеза, а именно, с участием этого фермента в поставке CO_2 Рибулозобисфосфаткарбоксилазе/оксигеназе (Рубиско). Нокаут гена, кодирующего эту КА, приводил к ускорению, по сравнению с ДТ, транспорта электронов через ФС1 и ФС2 и к снижению скорости ассимиляции углекислого газа. В этих мутантах наблюдалось увеличение содержания хлоропластных и пероксисомных изоформ аскорбатпероксидазы, фермента, катализирующего восстановление H_2O_2 до H_2O . Такое возрастание свидетельствует о протекании, в отсутствие α КА1, с большими, чем в ДТ, скоростями реакций восстановления O_2 до H_2O в хлоропластах и о большей скорости фотодыхания, приводящего к образованию пероксида водорода в пероксисомах.

Другая стромальная КА, β КА1, которая является наиболее распространенной КА в растительной клетке, не играет, согласно нашим данным, ключевой роли в поставке CO_2 Рубиско, поскольку выключение гена её биосинтеза не приводило к уменьшению максимальных скоростей ассимиляции CO_2 . При этом наблюдаемые в мутантах по β КА1, по сравнению с ДТ, изменения характерны для протон-движущей силы на тилакоидной мембране предполагают, что β КА1 может играть роль в регуляции pH стромы.

Работа была поддержана Российским научным фондом, исследовательский проект № 17-14-01371.

**ОРГАНИЗАЦИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ КОРТИКУЛЯРНОГО
ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА**
Organization and functioning of the cortical photosynthetic apparatus

**Татьяна Савченко^{1*}, Мария Сундырева², Денис Яныкин¹, Андрей Хоробрых¹,
Галина Семенова³**

- 1 – Институт фундаментальных проблем биологии, ФИЦ ПНЦБИ РАН
2 – Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия
3 – Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
*e-mail: savchenko_t@rambler.ru, тел. +7 496 733601

До настоящего времени мы обладаем скудными данными о молекулярной организации, структурных и функциональных особенностях фотосинтетического аппарата хлоропластов внутренней коры одревесневших органов растений, ничего не известно о вкладе кортикального фотосинтеза в формирование устойчивости многолетних растений к неблагоприятным условиям окружающей среды. Наши исследования фотосинтетического аппарата хлоренхимных тканей лозы винограда *Vitis vinifera* позволили выявить ряд характерных особенностей его организации и функционирования, механизмов формирования нефотохимического тушения, устойчивости к неблагоприятным факторам внешней среды. Электронно-микроскопические исследования показали, что хлоропласты лозы характеризуются небольшими размерами (2–4 мкм), организация мембранных структур мало отличается от хлоропластов листа, хотя в ходе созревания лозы заметно возрастает степень уплощенности хлоропластов. Хлоропласты одревесневшей лозы можно охарактеризовать как амилохлоропласты. Сравнение сортов, отличающихся по морозостойкости, показал, что морозостойкие сорта характеризуются более высокими значениями активности кортикального фотосинтеза и более высокой адаптивностью фотосинтетического аппарата к меняющимся условиям среды. Полученные данные свидетельствуют о том, что функционирование кортикального фотосинтетического аппарата вносит вклад в формирование морозостойкости многолетних растений.

**РАЗРАБОТКА МОДУЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ
КАРОТИНОИДОВ НА ОСНОВЕ ВОДОРАСТВОРИМОГО ЦИАНОБАКТЕРИАЛЬНОГО
КАРОТИНОПРОТЕИНА *Anabaena* sp. PCC 7120**
**Development of a modular system for targeted delivery of carotenoids based on
water-soluble cyanobacterial carotenoprotein *Anabaena* sp. PCC 7120**

Е. А. Слущкая^{1,2*}, А. В. Степанов², Н. Н. Случанко^{1,3}, Е. Г. Максимов^{1,3}

- 1 – Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Россия, Москва
2 – ФГБУН ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва
3 – Институт биохимии имени А. Н. Баха РАН, Россия, Москва
*e-mail: slutskay@yandex.ru, тел. +7 916 0988506

Образование активных форм кислорода (АФК) сопровождается реакции переноса электронов во время аэробного дыхания или фотосинтеза. Поскольку высокий уровень АФК может быть вредным для клеток, антиоксиданты имеют решающее значение для поддержания их нормального функционирования. Каротиноиды являются превосходными природными антиоксидантами, играющими важную роль в фотозащите и регуляции фотосинтетической активности высших растений, водорослей и цианобактерий, но их использование и направленная доставка в клетки чрезвычайно ограничены из-за их гидрофобной природы и быстрой фотодеструкции. Клетки млекопитающих не могут производить каротиноиды, но каротиноиды необходимы для человека и животных. Например, β -каротин является источником ретинала, кофактора зрительных фоторецепторов. Интерес к системам, обеспечивающим антиоксидантам стабильность и способствующим адресной доставке, во многом объясняется перспективностью их использования для создания лекарственных препаратов. Мы показали, что недавно открытый водорастворимый каротинопротеин, гомологичный С-домену оранжевого каротиноидного белка (ОСР, Orange Carotenoid Protein), из *Anabaena* sp. PCC 7120 (AnaCTDH) может взаимодействовать с мембранами, эффективно экстрагируя каротиноиды с образованием гомодимера AnaCTDH фиолетово-пурпурного цвета. Мы обнаружили, что перенос каротиноидов между белками и липидными мембранами обратим, и что эффективность этого процесса в значительной степени зависит от взаимодействий белка и каротиноида. Мы продемонстрировали, что AnaCTDH можно использовать для доставки каротиноидов в мембраны липосом и клеток млекопитающих с почти 70% эффективностью. Для исследования процессов переноса каротиноидов с помощью флуоресцентной микроскопии мы создали химеру TagRFP-AnaCTDH, в которой добавление флуоресцентного модуля TagRFP (~ 26 кДа) к N-концу AnaCTDH (~ 15 кДа) не нарушило реакции связывания и передачи каротиноидов. Способность AnaCTDH извлекать кантаксантин из мембран потенциально может быть использована для лечения патологических состояний, например, кантаксантиновой ретинопатии. AnaCTDH можно рассматривать как часть модульных систем для адресной доставки антиоксидантов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №. 17-74-30019.

Работа частично поддержана совместным грантом Российского фонда фундаментальных исследований и Немецкого исследовательского фонда (№ 20-54-12018 и № FR1276 / 6-1).

РН-ЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА В ХЛОРОПЛАСТАХ *IN SITU* AND *IN SILICO*: НЕИНВАЗИВНЫЙ МЕТОД РЕГИСТРАЦИИ ЭЛЕКТРОННОГО ПЕРЕНОСА МЕЖДУ ФОТОСИСТЕМАМИ

И. С. Сусличенко, Б. В. Трубицин, А. В. Вершубский, А. Н. Тихонов*

Физический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова
*e-mail: an_tikhonov@mail.ru

Цитохромный комплекс b_6f и молекулы пластохинона находятся на пересечении нескольких путей электронного транспорта в хлоропластах [1–3]. Предпосылкой для выполнения данной работы послужила необходимость количественно оценить динамику изменений редокс-состояния фотоактивного пула пластохинона в контексте рН-зависимой регуляции электронного транспорта в хлоропластах высших растений *in situ* [4]. В настоящей работе мы использовали разработанный нами подход для неинвазивного измерения емкости пула электронных переносчиков в электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) между двумя фотосистемами. В качестве удобной экспериментальной модели были выбраны листья *Hibiscus rosa-sinensis* [5]. Для количественного анализа регуляции электронного и протонного транспорта, сопряженного с синтезом АТФ, была разработана математическая модель, учитывающая стадии активации и торможения электронного транспорта на различных участках ЭТЦ хлоропластов [6]. Для измерения динамики фотоиндуцированных изменений электронной емкости межсистемного пула электронных переносчиков (параметр Q , равный числу электронов в расчете на P700) мы измеряли кинетику изменений сигнала ЭПР от окисленных фотореакционных центров P700 при «хроматических переходах» (белый свет → дальний красный свет). Измерения показали, что в листьях, адаптированных к темноте, в ответ на включение белого света наблюдаются немонокотонные изменения параметра Q . Сначала происходит быстрый рост параметра Q от 2,5 до 12, а затем наблюдается его монотонное уменьшение до $Q \approx 6$. Установлено, что падение Q обусловлено ослаблением фотовосстановления пластохинона, вызванного уменьшением внутритилакоидного рН, с одной стороны, и ускорением окисления пластохинола за счет активации реакций цикла Кальвина, с другой стороны. Разработанный нами метод неинвазивного измерения емкости пластохинонового пула в ЭТЦ между фотосистемами был использован для сравнительного исследования регуляции фотосинтетического транспорта электронов в листьях контрастных видов растений, выращенных в различных условиях (освещение, температура).

Работа поддержана Российским научным фондом (проект 21-74-20047).

1. Tikhonov AN (2013) pH-Dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts. *Photosynth Res* 116:511–534
2. Tikhonov AN (2014) The cytochrome b_6f complex at the crossroad of photosynthetic electron transport pathways. *Plant Physiol Biochem* 81:163–183
3. Tikhonov AN (2015) Induction events and short-term regulation of electron transport in chloroplasts: an overview. *Photosynth Res* 125:65–94
4. Suslichenko IS, Tikhonov AN (2019) Photo-reducible plastoquinone pools in chloroplasts of *Tradescantia* plants acclimated to high and low light. *FEBS Lett* 593:788–798
5. Trubitsin BV, Vershubskii AV, Prikloński VI, Tikhonov AN (2015) Short-term regulation and alternative pathways of photosynthetic electron transport in *Hibiscus rosa-sinensis* leaves. *J Photochem Photobiol B* 152:400–415
6. Tikhonov AN, Vershubskii AV (2014) Computer modeling of electron and proton transport in chloroplasts. *BioSystems* 121

ВЫЗВАННЫЕ ЛОКАЛЬНЫМ ДЕЙСТВИЕМ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОРОВ СИСТЕМНЫЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ОТВЕТЫ РАСТЕНИЙ: МЕХАНИЗМЫ И ДИСТАНЦИОННЫЙ МОНИТОРИНГ
Systemic plant photosynthetic responses induced by local actions of abiotic stressors: mechanisms and remote sensing

Владимир Сухов*, Екатерина Сухова

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603950, Россия
*e-mail: vssuh@mail.ru, тел. +7 909 2928653

Растения существуют в изменчивой среде и подвержены системному и локальному действию абиотических стрессоров (неблагоприятные температуры, засуха, избыточная освещенность и др.). Фотосинтез, играющий ключевую роль в жизни растений, является одной из основных мишеней действия таких стрессоров. В частности, при локальном действии стрессоров происходит развитие системных фотосинтетических ответов, которое связано с распространением дистанционных стрессовых сигналов (прежде всего, электрических сигналов, ЭС).

Известно, что ЭС вызывают обратимое снижение активности фотосинтетических процессов, включая уменьшение ассимиляции CO_2 , квантовых выходов фотосистемы I и II и величины нециклического потока электронов, а также увеличение энергозависимой компоненты нефотохимического тушения флуоресценции и циклического потока электронов вокруг фотосистемы I. Фотосинтетическая инактивация включает в себя две компоненты: быструю, которая развивается в пределах 3–10 минут, и длительную, которая развивается в течение нескольких десятков минут и сохраняется длительное время. Развитие быстрой инактивации индуцируется снижением активности H^+ -АТФ-азы плазматической мембраны при распространении ЭС. Такое снижение приводит к уменьшению проводимости клеток мезофилла листа для CO_2 вследствие защелачивания апопласта, а также – к снижению нециклического потока электронов и возрастанию нефотохимического тушения и циклического потока электронов вследствие закисления цитоплазмы, стромы и люмена. По-видимому, индуцированные ЭС фотосинтетические изменения приводят к повышению устойчивости фотосинтетического аппарата растений к действию абиотических стрессоров (прежде всего, повышенной температуры).

Связь системных фотосинтетических ответов с действием стрессоров и развитием защитных изменений у растений делает значимым поиск путей дистанционного мониторинга таких ответов. В настоящее время, существует достаточно ограниченное число работ, посвященных этой проблеме. Прежде всего, показано влияние распространения ЭС на узкополосный фотохимический индекс отражения (PRI). При этом изменения PRI сильно коррелированы с изменениям фотосинтетических параметров. Комплексный анализ массива всех возможных узкополосных индексов отражения, рассчитанных на основе 400–700 нм спектрального диапазона, показывает, что существуют целые спектральные области чувствительные к распространению ЭС. При этом, изменения индексов отражения, полученных на основании таких спектральных областей, тесно связаны с изменениями фотосинтетических показателей. Вызванные ЭС изменения могут быть также выявлены при анализе «широкополосных» индексов отражения; однако, такие изменения связаны скорее со сдвигами содержания воды в листьях, нежели с фотосинтетическими ответами.

В целом, полученные результаты показывают, что ЭС являются значимым механизмом регуляции фотосинтеза при локальном действии стрессоров. Вызванные ЭС фотосинтетические изменения могут быть потенциально выявлены методами оптического дистанционного мониторинга, что создает основу для развития новых подходов к выявлению стрессовых изменений у растений.

Работа была поддержана Российским научным фондом (грант №17-76-20032).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНДЕКСОВ ОТРАЖЕНИЯ В ВИДИМОМ ДИАПАЗОНЕ СВЕТА ДЛЯ ОЦЕНКИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФОТОСИНТЕЗА ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ СТРЕССОРОВ
The application of difference reflectance indices based on visible light for the estimation and prediction of photosynthetic activity changes in higher plants under influence of stressors

Екатерина Сухова*, Анастасия Рябкова, Любовь Юдина, Екатерина Громова, 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

Свет играет важную роль в жизни растений, являясь источником энергии и регулируя процессы роста и развития. Также свет может нести информацию о процессах в растениях, включая активность фотосинтеза, развитие его стрессовых изменений, состав и соотношение пигментов и т. д. Одним из перспективных подходов для оценки состояния растения является анализ отраженного света с помощью индексов отражения, который характеризуется относительной простотой измерения и высокой информативностью. При этом может быть реализован комплексный анализ индексов, который позволяет оценить наиболее чувствительные к состоянию растения спектральные области.

Первая часть работы была связана с выявлением оптических областей, чувствительных к воздействию на растения стрессоров (почвенная засуха, нагрев) и распространения электрических сигналов. Был проведен комплексный анализ индексов отражения у гороха, пшеницы и тыквы. При развитии засухи, были обнаружены области с достоверными различиями абсолютных величин индексов отражения в опыте и контроле. На их основании были отобраны индексы отражения, показавшие высокую связь с максимальным квантовым выходом фотосистемы II и содержанием воды в растениях. Среди них высокую эффективность показали индексы в области активности хлорофиллов и ксантофиллов [1]. В отличие от этого, краткосрочные воздействия (нагрев, электрические сигналы) влияли, прежде всего, на светоиндуцированные изменения индексов отражения [1, 2].

Вторая часть работы связана с комплексным анализом применимости индексов отражения для фенотипирования растений. В исследовании использовались 10 сортов пшеницы. Нами был проведен корреляционный анализ показателей фотосинтеза более взрослых растений в контроле и при развитии почвенной засухи с индексами отражения в видимом диапазоне света, измеренными у молодых растений в контроле и в условиях осмотического шока. Была показана возможность прогнозирования активности фотосинтеза у более взрослых растений по индексам отражения более молодых растений. При этом спектральные свойства обработанных и необработанных осмотиками растений могут быть использованы при фенотипировании растений для количественного прогнозирования фотосинтетических параметров более взрослых растений в условиях засухи.

Таким образом, были выявлены спектральные области, позволяющие оценивать текущее состояние растений в условиях действия стрессоров и предсказывать фотосинтетический ответ на действие стрессоров у более взрослых растений по показателям более молодых.

Работа была поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований (грант № 20-016-00234 А и № 20-316-80030 мол_эв_а).

1. Sukhova E., Yudina L., Gromova E., Ryabkova A., Kior D., Sukhov V. *Remote Sens.* 2021, 13, 962
2. Sukhova E., Yudina L., Gromova E., Ryabkova A., Vodenev V., Sukhov V. *Plants* 2021, 10, 878

УЧАСТИЕ ЛЮМЕНАЛЬНОЙ КАРБОАНГИДРАЗЫ САНЗ В СОХРАНЕНИИ ВЫСОКОЙ АКТИВНОСТИ ФОТОСИСТЕМЫ 2 В *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*
Involvement of luminal carbonic anhydrase SAN3 in maintaining high photosystem II activity in *Chlamydomonas reinhardtii*

Василий Терентьев*, Анна Шукшина

ИФПБ РАН, Пушкино

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

Фотосинтезирующие организмы обладают различными механизмами защиты фотосинтетического аппарата от избытка света, который может приводить к фотоингибированию и даже повреждению фотосистем (ФС). В случае ФС2 такие механизмы приводят к быстрому снижению количества поглощенной энергии света передаваемой на реакционный центр (РЦ) за счет ее рассеивания в виде тепла, а также уменьшения физического размера антенны ФС. Это так называемое нефотохимическое тушение (NPQ) флуоресценции хлорофилла (Хл) [1]. NPQ индуцируется низким pH, формирующимся в люмене за счет образования H^+ в результате реакции окисления воды в водоокисляющем комплексе (ВОК) ФС2, а также активности Q-цикла. Карбоангидраза САНЗ, расположенная в люмене *C. reinhardtii* вблизи ФС2, как предполагается, вовлечена в ускорение «нейтрализации» избытка H^+ вблизи ВОК за счет своей дегидратазной активности ($H^+ + HCO_3^- \rightarrow H_2O + CO_2$), таким образом поддерживая высокую активность ФС2, что было показано на мембранных препаратах, обогащенных ФС2 [2, 3]. В данной работе при детекции автофлуоресценции Хл с помощью конфокального микроскопа наблюдалось формирование необычной для *C. reinhardtii* морфологии хлоропласта в клетках мутанта *cia3*, лишённого САНЗ в люмене тилакоидов, при действии света средней интенсивности (~200 мкмоль $m^{-2}c^{-1}$) при 5% CO_2 (условия выращивания) в отличие от клеток дикого типа (ДТ) (СС-503). Хлоропласт терял четкое разделение на базальную область и доли, расширялся во внутреннюю часть клетки, пиреноид исчезал, в то время как в случае ДТ хлоропласт сохранял чашеобразную форму, область пиреноида хорошо детектировалась. При этом, фотосинтетические параметры ФС2 в клетках ДТ и *cia3* показали схожие значения как максимального, так и эффективного квантовых выходов ФС2. NPQ в *cia3* хоть и было изначально в 1,5 раза выше чем в ДТ, что свидетельствовало об активных фотопротектирующих механизмах, в результате освещения светом средней интенсивности практически полностью ингибировалось. Подобное ингибирование NPQ повышенным CO_2 ранее наблюдалось для ДТ *C. reinhardtii*, но только при действии светом высокой интенсивности [4]. Изучение белкового состава клеток с помощью вестерн-блот-анализа показало, что после действия света средней интенсивности количество белков D1 и PsbO снижалось в ДТ (на ~15%), что свидетельствовало об адаптации фотосинтетического аппарата к новым условиям освещения. Однако в *cia3*, наоборот, количество белков D1 и PsbO повышалось на ~10%, что, вероятно, могло быть компенсацией фотоингибированных РЦ. Полученные данные свидетельствуют о том, что в отсутствие САНЗ (*cia3*) необычная для *C. reinhardtii* морфология хлоропласта является способом защиты основной части ФС2 от фотоингибирования, которое может происходить в результате отсутствия NPQ и формирования в люмене слишком низкого pH, даже при такой не стрессовой для ДТ интенсивности света. Вероятно, что внешние слои тилакоидов в *cia3* служат своеобразными экранами, поглощающими избыток света, в результате чего ФС2 внутренних слоев функционируют в оптимальных условиях с высокой эффективностью, что видно, например, при сравнении эффективного квантового выхода в клетках, соответственно, ДТ и *cia3*.

1. Ruban et al., 2016, *Plant Physiol*
2. Shutova et al., 2008, *EMBO J*
3. Terentyev et al., 2019, *BBA*
4. Polukhina et al., 2016, *Plant Physiol*

**МОДЕЛИРОВАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ: ОТ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ОТДЕЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ К АГЕНТНОЙ МОДЕЛИ ХЛОРОПЛАСТА**
**Photosynthetic electron flow models: from transient protein-protein interactions
towards rule-based model of the chloroplast**

Сергей Хрущев*, Владимир Федоров, Алексей Маслаков, Татьяна Плюснина,
Илья Коваленко, 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) 939-14-02

Современные методы исследования ультраструктуры биологических систем позволили накопить обширную информацию о строении фотосинтетических мембран. К настоящему времени с помощью методов рентгеноструктурного анализа, ядерного магнитного резонанса, криоэлектронной и атомно-силовой микроскопии подробно изучена структура большинства молекулярных структур, участвующих в электронном транспорте, в частности, белков и образуемых ими комплексов. Методы молекулярного моделирования (а в последние годы – и экспериментальные методы исследования структуры отдельных молекул с использованием рентгеновского лазера) позволили увидеть происходящие на молекулярном уровне процессы в динамике. Развитие метода просвечивающей электронной микротомографии позволило получить детальную информацию об организации системы гранальных и стромальных ламелл в хлоропласте. На основе этих данных нами разработана оригинальная агентная модель процессов фотосинтетического электронного транспорта с учетом реальной геометрии хлоропласта. Используется аналитическая модель геометрии грани и прилегающих к ней стромальных ламелл. Изменение числовых параметров модели позволяет варьировать форму компартментов и исследовать влияние геометрических параметров тилакоидов на первичные процессы фотосинтеза. На основе аналитической модели создается ее представление в виде решеточной модели с ромбододекаэдрическими ячейками и периодическими граничными условиями. Каждой ячейке присваивается идентификатор компартмента: строма, люмен либо тилакоидная мембрана, и производится расстановка неподвижных трансмембранных белковых комплексов, которые занимают часть ячеек, и мобильных переносчиков электрона. Подвижность мобильных переносчиков электронов и протонов моделируется по принципу клеточного автомата: исходя из экспериментально оцененных значений коэффициента диффузии, на каждом шаге моделирования рассчитывается вероятность перемещения агента в соседнюю ячейку. Окислительно-восстановительные реакции с участием трансмембранных комплексов моделируются с использованием предварительно рассчитанных матриц перехода между состояниями комплекса. На основе литературных данных идентифицированы параметры модели. На языке программирования Python создан прототип программного обеспечения, осуществляющего подготовку модельной сцены, расчёт матриц переходов между состояниями комплексов и собственно моделирование диффузии переносчиков и их взаимодействия с трансмембранными белками. Для визуализации происходящих в модели процессов на молекулярном уровне программное обеспечение интегрировано с пакетом PyMOL.

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ №121032500060-0 при частичной поддержке грантов РФФИ № 19-04-00999 и 20-04-00465.

**Влияние раздражителей разной природы на синтез
ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В ЭТИОЛИРОВАННЫХ
РОСТКАХ ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР НА СВЕТУ**
**Influence of irritants of different nature on the synthesis of photosynthetic pigments
in etiolated cereal sprouts in the light**

Наталья Шамаль

Институт радиобиологии НАН Беларуси, Гомель, ул. Федюнинского, 4, 246007, Беларусь
*e-mail: namahasha@rambler.ru, тел. +810-375-232-34-97-56

Гамма-облучение семян в небольших дозах ведет к ускорению темпов развития растений, активации процессов био- и фотосинтеза, что приводит к повышению урожайности растений. Эффект стимуляции бывает нестабильным, вследствие влияния на растения иных факторов. Одним из таких факторов является засоление. Целью исследования было изучение влияния гамма-облучения семян ржи и ячменя и последующее засоление среды прорастания на скорость синтеза фотосинтетических пигментов в формирующихся ростках. Семена облучали на γ -установке в дозе 2,5 и 5,0 Гр (источник ^{137}Cs , мощность дозы 12,3 сГр/мин) и далее проращивали на дистиллированной воде или 1,0% р-ре NaCl. Эффективность синтеза фотосинтетических пигментов (ФСП: хлорофилл *a*, *b* и каротиноиды) оценивали по их концентрации в этиолированных ростках, которые экспонировали на свету 10 ч при 10 тыс. лк, имитируя переход растений с темного пути развития на световой, сопровождающийся накоплением хлорофилла и зеленеением листа. Влияние облучения оценивали на 3-и и 7-е сутки прорастания, засоления – на 7-е, что связано с торможением процесса прорастания растений.

Гамма-облучение семян стимулирует синтез каротиноидов и предшественника хлорофилла в зеленеющих ростках. Для растений ржи увеличение суммы хлорофиллов в ростках на 3-и сутки, соответственно при облучении в дозе 2,5 и 5,0 Гр, составило 10,0 и 26,2%, каротиноидов – на 12,4 и 18,2%. На 7-е сутки прорастания концентрация хлорофиллов была выше на 7,7 и 17,2%, каротиноидов – 2,1 и 21,1% по сравнению с концентрацией ФСП в ростках необлученных растений. При этом увеличение концентрации хлорофиллов происходило в большей степени за счет хлорофилла *a*, чем хлорофилла *b*. Для растений ячменя картина была аналогичной по активации синтеза хлорофилла. Увеличение концентрации хлорофиллов составило от 4,5 до 51,4% в зависимости от дозы облучения и времени прорастания. В то же время было отмечено торможение синтеза каротиноидов. Их концентрация была выше контрольного уровня на 8,7% в варианте с облучением семян в дозе 5,0 Гр на 3-и сутки. А на 7-е сутки содержание каротиноидов в проростках облученных вариантов было ниже почти в 2 раза.

В условиях засоления у растений ржи отмечено снижение ФСП во всех вариантах, а у растений ячменя повышение, что предположительно связано с ростом и дифференциацией клеток проростков. При этом в условиях засоления в проростках облученных вариантов отмечено сохранение эффекта активации синтеза пигментов по сравнению с необлученными вариантами в тех же условиях. В проростках ржи концентрация хлорофиллов вариантов 2,5 и 5,0 Гр была выше на 18,6 и 54,4%, каротиноидов – на 5,4 и 13,3%. В проростках ячменя концентрация хлорофиллов была выше на 6,5 и 65,0%, каротиноидов – на 11,2 и 79,9% соответственно. При этом увеличение пигментов также шло в большей степени за счет хлорофилла *a*, чем хлорофилла *b*.

Таким образом, предпосевное облучение семян в дозах 2,5 и 5,0 Гр активирует процесс синтеза предшественников фотосинтетических пигментов в проростках злаковых культур, при этом условия прорастания не влияют на этот процесс. В условиях засоления синтез ФСП зависит от солеустойчивости культуры, при этом эффект стимуляции синтеза предшественника хлорофиллов в темновой период прорастания семян сохраняется.

**ВЛИЯНИЕ БЕЛКА КАРБОНГИДРАЗЫ САНЗ НА СТРУКТУРНО-
ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ВОДООКИСЛЯЮЩЕГО КОМПЛЕКСА
ФОТОСИСТЕМЫ 2 ИЗ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII***

**Influence of the carbonic anhydrase САНЗ protein on the structural and functional
state of the photosystem 2 water-oxidizing complex from *Chlamydomonas reinhardtii***

Анна Шукшина*, Василий Терентьев

ИФПБ РАН, Пущино

*e-mail: sshukshinka@gmail.com, тел. +7 915 2690753

Металлоферменты карбоангидразы (ЕС 4.2.1.1.) катализируют реакцию взаимопревращения диоксида углерода (CO_2) и бикарбоната (HCO_3^-) [1]. Показано, что карбоангидразы могут оказывать влияние на функционирование фотосистемы 2 (ФС2), при этом для α -карбоангидразы САНЗ из зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* была обнаружена ее ассоциация с донорной стороной ФС2 [2]. В наших работах мы показываем, что САНЗ может оказывать влияние на структурно-функциональное состояние водоокисляющего комплекса (ВОК) ФС2 [3, 4]. Целью данной работы было изучить влияние белка САНЗ на структурно-функциональное состояние ВОК ФС2 при повышении ионной силы раствора, что должно индуцировать конформационные перестройки белков и даже диссоциацию белков из ВОК. Объектами исследования выступали мембранные частицы, обогащенные ФС2, из дикого типа (ДТ) и из САНЗ-лишенного мутанта *cia3* *C. reinhardtii*. Исследовали фотоиндуцированное выделение O_2 , переменную флуоресценцию хлорофилла, а также был проведен вестерн-блот-анализ препаратов ФС2 с использованием антител против белков D1 (PsbA), PsbO и PsbP. При оптимальных условиях для функционирования ВОК (рН 6,5, 35 мМ NaCl, 400 мМ сахарозы) O_2 -выделяющая активность ФС2 была одинаковой у препаратов из ДТ и *cia3*. При повышении концентрации NaCl O_2 -выделяющая активность более выражено подавлялась в препаратах ФС2 из *cia3* по сравнению с ФС2 из ДТ. При 100 мМ NaCl она ингибировалась до 90% и 70%, соответственно, в ФС2 из ДТ и *cia3*. Дополнительное инкубирование с NaCl значительно увеличивало эту разницу: при 100 мМ NaCl и 30 мин инкубации O_2 -выделяющая активность снижалась до 80% и 50%, соответственно, в ФС2 из ДТ и *cia3*. Однако, повышение концентрации NaCl от 35 до 100 мМ не влияло на выход переменной флуоресценции хлорофилла, отражающего эффективность фотоиндуцированного переноса электронов в РЦ ФС2, в препаратах из ДТ и *cia3*. Изучение белкового состава препаратов ФС2 из ДТ и *cia3* с помощью вестерн-блот-анализа при разных концентрациях NaCl (35–500 мМ) показало равное содержание белка PsbO относительно белка D1 при всех условиях измерений. При этом содержание белка PsbP снижалось с повышением NaCl. При чем, это было более выражено в ФС2 из ДТ: содержание PsbP составляло ~75% при 100 мМ NaCl и только ~10% при 500 мМ NaCl. В то время как содержание белка PsbP в ФС2 из *cia3* не снижалось при 100 мМ NaCl, а при 500 мМ NaCl в препаратах сохранялось до 30% белка. Таким образом, белок САНЗ, по-видимому, вовлечен в стабилизацию структурно-функциональной организации ВОК [5].

1. Руденко с соавт. (2015) Биохимия
2. Karlsson et al. (1998) EMBO J
3. Terentyev et al. (2019) BBA Bioenergetics
4. Terentyev et al. (2020) Life
5. Шукшина с соавт. (2021) Биохимия (принята к печати)

СЕКЦИЯ 3. ФОТОРЕЦЕПЦИЯ

**ЛАЗЕРНЫЙ RGB МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕТИНАЛЬНОЙ ОСТРОТЫ
ЗРЕНИЯ ЧЕЛОВЕКА И СПЕКТРАЛЬНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
КОЛБОЧЕК В ФОВЕАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ СЕТЧАТКИ
RGB laser method for determining human retinal visual acuity and spectral
sensitivity of cones in the foveal region of the retina**

Гариф Акчурин^{1*}, Георгий Акчурин¹, Владимир Максимов²

1 – СГУ, ИПТМУ РАН, г. Саратов

2 – ЦЛКЗ, г. Саратов

* e-mail: Akchuring@mail.ru, тел. +7 927 1199810

Предложен и апробирован спектральный лазерный трехволновый ретинометр, позволивший определить макулярную остроту зрения человека для «красных», «зеленых» и «синих» колбочек и впервые установить, что плотность матрицы цветных фоторецепторных клеток в фовеа равномерная, в отличие от периферии.

Классические методы исследования функции зрения человека сводятся к определению остроты зрения и поля зрения, которые в значительной степени зависят от состояния прозрачных сред глаза. От этого избавлен лазерный метод определения ретиальной остроты зрения (РОЗ), позволяющий определять разрешающую способность сетчатки. При ретинометрии лазерный пучок делят на два пучка приблизительно равной интенсивности и направляют их в глаз таким образом, чтобы они перекрывались на сетчатке. В результате наложения когерентных пучков на сетчатке образуется интерференционная картина в виде полос. Влияние рефракции глаза на число полос в значительной мере исключается, если оба пучка фокусируются в узловой плоскости глаза. Одно из основных преимуществ лазерной ретинометрии – возможность определения разрешающей способности сетчатки при наличии катаракты. Апробация метода определения спектральной ретиальной остроты зрения человека при зондировании фоторецепторных «синих», «зеленых» и «красных» колбочек при облучении пространственно-перестраиваемой системой интерференционных полос, создаваемых перестраиваемым интерферометром Жамена. В интерферометре использовалось непрерывное излучением гауссовых пучков, создаваемых YAG: Nd микролазерами с диодной накачкой и удвоением частоты с длинами волн 473 нм и 532 нм и полупроводниковым инжекционным гетеролазером с длиной волны 650 нм.

Предложен и апробирован лазерный метод определения спектральной чувствительности колбочек глаза в фовеальной области сетчатки человека *in vivo* при зондировании одновременно двумя когерентными гауссовскими пучками с длинами волн излучения 633 нм и 532 нм, близких к максимуму поглощения «красных», «зеленых» колбочек, при их пространственном перекрытии и взаимном изменении лазерной интенсивности одного из них при фиксированной мощности другого. Экспериментально установлено непрерывное спектральное смещение цвета от желтого к красному или зеленому, наблюдаемого в области перекрытия гауссовых пучков, вызванных взаимным изменением лазерной мощности. Полученные результаты позволяют утверждать, что указанные спектральные эффекты могут быть реализованы, если соседние «красные» и «зеленые» колбочки, возбуждающие свои ганглиозные клетки, связаны между собой и реагируют на разность оптических интенсивностей, которые детектируются «красными» и «зелеными» колбочками одновременно.

**АМИНОКИСЛОТНЫЕ ОСТАТКИ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ
Na⁺/H⁺-СПЕЦИФИЧНОСТЬ Na⁺-ТРАНСЛОЦИРУЮЩЕГО РОДОПСИНА
Identification of the key determinant of the transport promiscuity in
Na⁺-translocating rhodopsins**

Юлия Берцова*, Александр Богачев, Махир Мамедов

НИИ Физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского МГУ

*e-mail: bertsova@belozersky.msu.ru, тел. +7 495 9300086

Бактериальные Na⁺-транслоцирующие родопсины запасают энергию Солнечного света в виде электрохимического трансмембранного ионного потенциала. Обычно эти белки высоко-специфичны по отношению к Na⁺, но некоторые из них в безнатриевых средах также способны к трансмембранному переносу ионов H⁺. Для определения структурных основ ионной специфичности мы провели сравнение первичных и третичных структур различных Na⁺-родопсинов и выявили аминокислотную позицию, где во всех специфичных Na⁺-родопсинах присутствует цистеин, тогда как в Na⁺,H⁺-родопсинах – серин. Показано, что полученный нами Cys253Ser мутантный вариант специфичного Na⁺-родопсина из *Dokdonia* sp. PRO95 (NaR) в отличие от белка дикого типа действительно способен к светозависимому трансмембранному транспорту и Na⁺, и H⁺. Двойная ионная специфичность этого мутантного варианта NaR была также подтверждена при анализе его фотоцикла, выявившего ускорение стадии захвата катиона с цитоплазматической стороны мембраны в не содержащей ионов натрия среде измерения. Таким образом, показано, что замена в белке всего лишь одного атома (атома кислорода на атом серы) приводит к изменению ионной специфичности натриевого родопсина [1].

Работа была поддержана фондом РФФ (грант № 19-14-00063)

1. Mamedov A.M., Bertsova Y.V., Anashkin V.A., Mamedov M.D., Baykov A.A., Bogachev A.V. (2018) Identification of the key determinant of the transport promiscuity in Na⁺-translocating rhodopsins. *Biochem Biophys Res Commun.* 499:600–604.

ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ПРОДУКТЫ ФОТООКИСЛИТЕЛЬНОЙ ДЕСТРУКЦИИ А2Е И ЛИПОФУСЦИНОВЫХ ГРАНУЛ РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА ВЫЗЫВАЮТ МОДИФИКАЦИЮ БЕЛКОВ В ТЕМНОТЕ
Water-soluble products of photooxidative destruction of A2E and lipofuscin granules of the retinal pigment epithelium of the human eye cause protein modification in the dark

**А. Е. Донцов^{1*}, М. А. Яковлева¹, Н. Н. Трофимова¹, Н. Л. Сакина¹, А. А. Гулин⁴,
 А. В. Айбуш⁴, Ф. Е. Гостев⁴, М. Х. Хубецова², С. А. Борзенков², Т. Б. Фельдман^{1,3},
 М. А. Островский^{1,3}**

1 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН
 2 – ФГАУ МНТК «Микрохирургия глаза» имени С. Н. Федорова
 3 – МГУ им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет
 4 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н. Н. Семенова Российской академии наук

*e-mail: adontsovnick@yahoo.com Тел. +7 903 107-04-94

Старение сопровождается резким возрастанием содержания в клетках ретинонального пигментного эпителия (РПЭ) глаза человека липофусциновых гранул (ЛГ) и бисретиноида N-ретирил-N-ретилиденэтанолamina (A2E). Известно, что фотоокислительная деструкция A2E и других флуорофоров ЛГ приводит к образованию продуктов, способных оказывать токсическое действие на клетки РПЭ в темноте. Однако конкретные механизмы токсического действия ЛГ и A2E недостаточно изучены. В данной работе было исследовано влияние продуктов фотоокислительной деструкции ЛГ и A2E в отношении модификации белков наружных сегментов фоторецепторных клеток (НСФ) и бычьего сывороточного альбумина. ЛГ и A2E были облучены видимым светом (400–700 нм) галогенной лампы и полученные водорастворимые продукты фотоокислительной деструкции были исследованы на содержание карбонильных соединений методом масс-спектрометрии и реакцией с тиобарбитуровой кислотой. Показано, что водорастворимые продукты, образующиеся при фотоокислении как ЛГ, так и A2E и содержащие карбонильные соединения, вызывают модификацию белков, измеряемую по нарастанию интенсивности флуоресценции при 440–450 нм (длина волны возбуждающего света 365 нм). Водорастворимые фракции необлученных ЛГ и A2E были значительно менее активны как модификаторы белков. Аминогуанидин практически полностью ингибировал процесс модификации белков НСФ водорастворимой фракцией облученных ЛГ. Предполагается, что водорастворимые карбонильные продукты, образующиеся в результате фотоиндуцированного стресса в клетках РПЭ глаза человека, приводят к образованию и накоплению поврежденных белков, активации процессов воспаления и, как следствие, к прогрессированию различных старческих патологий глаза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации «Фундаментальные исследования нейродегенеративных заболеваний с позиции трансляционной медицины» (соглашение № 075-15-2020-795, внутренний номер 13.1902.21.0027).

НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЙ ИНГИБИТОР ПРОТЕИНФОСФАТАЗ NaF СТИМУЛИРУЕТ ТЕМНОВУЮ ДЕСТРУКЦИЮ ФИТОХРОМА А В ЕГО ЛАБИЛЬНОЙ ФОРМЕ phyA' В ЭТИОЛИРОВАННЫХ КОРНЯХ КУКУРУЗЫ
The non-specific protein phosphatase inhibitor sodium fluoride shifting the phosphatase/kinase balance in the cell stimulates phytochrome A dark destruction in its labile phyA' form in etiolated maize roots

Л. А. Коппель^{1*}, Е. А. Шор², В. А. Синешёков¹

1 – Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова
 2 – Faculty of Agriculture, Hebrew University, Rehovot, Israel
 *e-mail: koppellar@gmail.com

В фитохромной системе растений ключевым компонентом является фитохром А (phyA), осуществляющий различные типы фоторегуляторных ответов – сверхнизко-, низко- и высокоэнергетических (VLFR, LFR и HIR). Такая полифункциональность связана с обнаруженным нами существованием двух его модификаций – phyA' и phyA'' –, различающихся по спектральным, фотохимическим и функциональным свойствам [1]. phyA' отвечает за VLFR, тогда как phyA'' – за HIR и LFR. Различия между пулами обусловлены фосфорилированием phyA в N-концевом сегменте молекулы. Ранее мы установили зависимость состояния phyA и его пулов от фосфатазно-киназного равновесия в coleoptilyах кукурузы при действии ингибиторов протеинфосфатаз (PP) – оадаевой и кантаридиновой кислот (OA и CA) – и ее отсутствие в корнях [2]. В данной работе с использованием низкотемпературной флуорометрии было обнаружено действие неспецифического ингибитора PP – фторида натрия (NaF) – на phyA в корнях этиолированных проростков кукурузы, которое отсутствовало, однако, в coleoptilyах. NaF – ингибитор широкого спектра PP, в том числе и кислых серин-треониновых фосфатаз, активных в корнях растений. Кончики корней 2–3 дневных проростков кукурузы обрабатывали 1 mM NaF в течение 10 мин, 4 часов или 4 часов с последующей длительной (12 часов) отмывкой реагента в воде. Установлено, что инкубация с NaF в корнях уже через 10 мин. приводила к снижению концентрации лабильного пула phyA' на 1/3 и двукратному через 4 часа. Это обработка практически не влияла на относительно стабильный пул phyA'', что приводило к смещению их равновесия в сторону phyA''. Сходство действия неспецифического (NaF) и специфических (OA, CA) ингибиторов подтверждает сделанный ранее вывод о том, что состояние phyA и его пулов зависит от фосфатазно-киназного равновесия клетки. Различие характера действия указанных типов ингибиторов на phyA в корнях и coleoptilyах свидетельствует о разном состоянии фоторецептора в этих органах – в корнях он характеризуется большей стабильностью по сравнению с coleoptilyами – и/или о разных механизмах его деструкции.

1. Sineshchekov, 2019, *Functional Plant Biology*, 46, 118–135

2. Sineshchekov et al., 2013, *Photochemistry & Photobiology*, 89, 83–96

ДИЗАЙН ГИБРИДНЫХ ФОТОУПРАВЛЯЕМЫХ КОНСТРУКЦИЙ Design of hybrid photoactive structures

Евгений Максимов

МГУ имени М. В. Ломоносова, биологический факультет
*e-mail: emaksimoff@yandex.ru

В 2010 г. журнал Nature Methods признал оптогенетику «научным методом года». Примерно в то же время в статье журнала Science оптогенетика была названа «прорывом десятилетия» («Breakthrough of the Decade»). В настоящее время оптогенетика является одним из важнейших направлений в области нейронаук, поскольку предоставляет новые возможности для изучения структуры и функции головного мозга и является более тонким и точным методом, чем широко используемые сейчас методы электрической стимуляции, однако сфера его применения не ограничивается исследованиями высшей нервной деятельности. Все чаще оптогенетика применяется для исследования клеточных процессов и управления метаболизмом клетки. Успешность применения данного метода зависит от доступных исследователям молекулярных инструментов, позволяющих с помощью света управлять активностью различных компонентов клетки. Многие фотоактивные мембранные белки, ставшие инструментами оптогенетики, были обнаружены в зеленых водорослях и цианобактериях, однако для управления активностью цитоплазматических ферментов необходимы специальные фотоуправляемые системы. Одним из перспективных фотоактивных белков является водорастворимый оранжевый каротиноидный белок (orange carotenoid protein, OCP), играющий важную роль в защите фотосинтетического аппарата цианобактерий от фотоповреждения. В рамках доклада будет показано, каким образом понимание механизма фотоактивации OCP и особенностей его фотоцикла позволяет построить на его основе фотоуправляемые системы для управления активностью ферментов, доставки каротиноидов и инструменты для функционального имиджинга.

ФОТОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ДИМЕРА ХЛОРОФИЛЛА В БЕЛКАХ СЕМЕЙСТВА WSCP: ОКИСЛЕНИЕ ДОНОРОВ ЭЛЕКТРОНА Photochemical activity of chlorophyll dimer in WSCP: electron donor oxidation

К. В. Неверов^{1,2*}, Ю. Н. Обухов^{1,2}, Ю. В. Малеева², М. С. Крицкий¹

1 – Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва
2 – Биологический факультет МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва
*e-mail: neverovk@mail.ru, тел. +7 903 1004034

Водорастворимые хлорофилл-связывающие белки (Water Soluble Chlorophyll-binding Proteins, WSCP) высших растений, в отличие от пигмент-белковых комплексов фотосинтетического аппарата, не связаны с тилакоидными мембранами и не участвуют в процессе фотосинтеза. Молекулы хлорофилла (Хл) в тетрамерных ансамблях WSCP упакованы в виде двух димеров. Такую же димерную организацию в реакционных центрах фотосистем имеет «специальная пара» (бактерио)хлорофиллов, выполняющая роль донора электрона в первичном фотохимическом акте. Несмотря на обнаруженную способность димера Хл в WSCP генерировать на свету возбужденное триплетное состояние, фотохимические свойства этих белков изучены не были [1].

Для выяснения способности WSCP к индукции фотохимических реакции нами было изучено взаимодействие рекомбинантных холоформ WSCP подклассов Па и Пб с донорами электрона, НАДН и аскорбатом при облучении растворов красным светом, поглощаемым только Хл. Было зарегистрировано окисление доноров без фотодеструкции Хл в составе WSCP, что указывает на фотокаталитический характер обнаруженной редокс-реакции. Константа скорости фотоокисления НАДН была в 4 раза выше для WSCP подкласса Па (BoWSCP), чем для подкласса Пб (LvWSCP). Кинетика фотоокисления была быстрее для аскорбата, чем для НАДН; с учетом того, что НАДН является более сильным восстановителем, это, возможно, указывает на наличие стерического фактора, определяющего доступность редокс-агентов к фотокаталитическому центру тетрамеров WSCP.

Снижение скорости сенсibilизированного WSCP фотоокисления НАДН в бескислородных условиях или при добавлении NaN_3 – тушителя триплетного состояния и синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$) – позволило заключить, что данная реакция может инициироваться триплетным димером Хл как напрямую, так и посредством генерации $^1\text{O}_2$. Согласно данным спектроскопии кругового дихроизма, $^1\text{O}_2$ вызывал также частичную диссоциацию димеров Хл в WSCP во время облучения.

Обнаруженная в данном исследовании фотокаталитическая активность димера Хл в WSCP открывает перспективу создания на базе этих белков моделей эволюционных прототипов безмембранного фотосинтеза, а также искусственных конверторов солнечной энергии. Для достижения этих целей необходимо продемонстрировать возможность фотосенсibilизированных WSCP редокс-реакций с акцепторами электрона. Предварительные результаты этих исследований обсуждаются в докладе.

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

1. Малеева Ю.В., Неверов К.В., Обухов Ю.Н., Крицкий М.С. Водорастворимые хлорофилл-связывающие белки растений: структура, свойства и функции // Молекулярная биология. 2019, №6: Т. 53. стр. 998–1011.

**ОСОБЕННОСТИ ПРОТОННОГО ТРАНСПОРТА В МОЛЕКУЛЕ
ПРОТЕОРОДОПСИНА *EXIGUOBACTERIUM SIBIRICUM*
Proton transport by the proteorhodopsin from *Exiguobacterium sibiricum***

**Лада Петровская^{1*}, Евгений Лукашев², Махир Мамедов³, Сергей Силецкий³,
Сергей Балашов⁴**

- 1 – ФГБУН Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, Россия
2 – Московский Государственный Университет им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет, 119234, Москва, Россия
3 – НИИ ФХБ им. А. Н. Белозерского, Московский Государственный Университет им. М. В. Ломоносова, 119992, Москва, Россия
4 – University of California, Irvine, CA92697, USA
*e-mail: lpetr65@yahoo.com, тел. +79151690412

В результате исследований свойств протеородопсина *Exiguobacterium sibiricum* (ESR) установлено, что остаток Lys96 в данном белке является донором протонов для основания Шиффа. В отличие от большинства микробных родопсинов, в которых эту функцию выполняют карбоксильные остатки, в ESR поглощение протона на цитоплазматической поверхности белка предшествует репротонированию основания Шиффа [1]. Выделение протона происходит в конце фотоцикла с участием акцептора протонов Asp85 и взаимодействующего с ним остатка His57 [2].

С помощью прямого электрометрического метода исследовано перемещение зарядов в процессе функционирования ESR и его мутантных вариантов [3–5]. Установлено, что пониженная эффективность мутанта K96A объясняется уменьшением прямого транспорта и повышением вклада обратных реакций [4]. При pH<5 эффективность транспорта в мутанте H57N в клетках *E. coli* и амплитуда электрогенного ответа в протеолипосомах оказалась существенно выше, чем в WT, что позволяет предположить, что взаимодействие His57 с Asp85 устанавливает нижний предел pH для этого процесса. Мутант H57N/K96A демонстрирует более высокую эффективность транспорта по сравнению с K96A, по-видимому, вследствие устранения обратных реакций между Asp85 и основанием Шиффа [5]. Полученные данные доказывают, что Lys96 функционирует как эффективный донор протонов при низком pH.

Работа проводится при финансовой поддержке гранта РФФИ 20-03-00139а.

- Balashov S.P., Petrovskaya L.E., Imasheva E.S., Lukashev E.P., Dioumaev A.K., Wang J.M., Sychev S.V., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K. *J. Biol. Chem.*, 2013, 288, 21254–21265
- Balashov S.P., Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Imasheva E.S., Dioumaev A.K., Wang J.M., Sychev S.V., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K. *Biochemistry*, 2012, 51, 5748–5762
- Siletsky S.A., Mamedov M.D., Lukashev E.P., Balashov S.P., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Petrovskaya L.E. *BBA-Bioenergetics*, 2016, 1741–1750
- Siletsky S.A., Mamedov M.D., Lukashev E.P., Balashov S.P., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Petrovskaya L.E. *BBA-Bioenergetics*, 2019, 1–11
- Siletsky S.A., Lukashev E.P., Mamedov M.D., Borisov V.B., Balashov S.P., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Petrovskaya L.E. *BBA-Bioenergetics*, 2021, 148328

**ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ
ГЕНА РОДОПСИНА *EXIGUOBACTERIUM SIBIRICUM*
Influence of culture conditions on the expression of the rhodopsin gene in
*Exiguobacterium sibiricum***

Артеми́й Суханов^{1,2*}, Елена Спирина², Лада Петровская³, Елизавета Ривкина²

- 1 – МГУ имени М. В. Ломоносова, Биотехнологический факультет, Москва
2 – Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, Пушкино
3 – Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва
*e-mail: ay.sukhanov@gmail.com, тел. +7 962 6600937

Родопсины – группа светочувствительных белков, осуществляющих светозависимый трансмембранный перенос ионов или сенсорные функции. Родопсины прокариот впервые были обнаружены и описаны в 1971 году [1]. С тех пор выявлено множество новых микробных родопсиноподобных белков, одним из которых является ESR – ретинальный белок психротрофной бактерии *Exiguobacterium sibiricum*, выполняющий функцию светозависимого протонного насоса [2].

Поиск гомологов ESR среди представителей рода *Exiguobacterium* позволил обнаружить белки со степенью сходства от 90 до 98% и тем самым расширил представления о степени его распространения в пределах рода *Exiguobacterium* в холодных экосистемах. Сравнение дендрограмм, полученных на основании филогенетического анализа белковых последовательностей гомологичных ESR и известных последовательностей гена 16S рРНК среди представителей рода *Exiguobacterium*, выявило сходные по составу кластеры, условно обозначенные нами как «холодные». Оба кластера включали следующих представителей рода *Exiguobacterium*: *E. antarcticum* (NR_043476), *E. undae* (NR_043477) и *E. sibiricum* (NR_075006), выделенных из образцов вечной мерзлоты восточного сектора Арктики; *E. soli* (NR_043241), обнаруженного в Сухих долинах и *E. undae* (NR_114811) из микробного мата озера Фрикселл (Антарктида). Анализ литературных данных показал, что, несмотря на то, что штаммы-продуценты ESR были обнаружены в экстремально холодных экосистемах, оптимальные условия для их роста – нейтральные или близкие к ним. Предположительно, помимо своей основной функции, родопсиновый белок ESR может быть связан с механизмами, обеспечивающими выживание и устойчивость бактерий рода *Exiguobacterium* в экстремальных условиях существования.

С целью определения режима культивирования, обеспечивающего максимальный уровень экспрессии гена протеородопсина ESR в клетках *E. sibiricum*, проведен широкомасштабный скрининг условий выращивания, включавший 4 варианта сред, наличие освещения, объем среды. Наиболее высокий уровень экспрессии гена ESR достигался при выращивании на стерильной водопроводной воде на свету. Проведено сравнительное исследование белкового профиля клеток *E. sibiricum*, выращенных на бедной и богатой средах методом протеомного анализа, а также устойчивости клеток в условиях высоких и низких значений температуры, различной кислотности, pH, концентрации углерода в среде в зависимости от экспрессии гена ESR.

Работа поддержана фондом РФФИ (грант №19-04-01240).

- Oesterhelt D., Stoeckenius W. (1971) Rhodopsin-Like Protein from the Purple Membrane of Halobacterium Halobium, *Nature*, V. 233, № 89, pp. 149–60.
- Petrovskaya LE, Lukashev EP, Chupin VV, et al. Predicted bacteriorhodopsin from *Exiguobacterium sibiricum* is a functional proton pump. *FEBS Lett.* 2010;584(19):4193–4196. doi:10.1016/j.febslet.2010.09.005

РОЛЬ КРИПТОХРОМА 1 В СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА РАСТЕНИЙ

ARABIDOPSIS THALIANA В РАЗЛИЧНЫХ СВЕТОВЫХ УСЛОВИЯХ

The role of cryptochrome 1 in the stress resistance of the photosynthetic apparatus of *Arabidopsis thaliana* plants under various light conditions

Александра Худякова^{1*}, Павел Пашковский², Валерия Строкина¹,
Владимир Креславский¹

1 – Институт фундаментальных проблем биологии РАН

2 – Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

*e-mail: s_t_i_m_a_@mail.ru, тел. +7 901 3327089

Криптохром 1 – фоторецептор, который опосредует индуцированное синим светом ингибирование удлинения гипокотилей и фотопериодический контроль инициации цветения, регулирует также другие световые реакции, включая циркадные ритмы, открытие устьиц, развитие корней и др. [1, 2]. Используя мутанты *Arabidopsis thaliana hu4* с дефицитом криптохрома 1, выращенные на синем (СС), красном (КС) и белом (БС) свету, мы изучили взаимосвязь между стрессоустойчивостью фотосинтетического аппарата растений к 4 ч облучению светом высокой интенсивности (СВИ) и 1 ч воздействию УФ-В.

СВИ и УФ-В снижали фотохимическую активность фотосистемы 2 (ФС2) и скорость фотосинтеза (P_n) у растений, выращенных как при умеренной (32 мкмоль квантов $m^{-2} s^{-1}$), так и более высокой (130 мкмоль квантов $m^{-2} s^{-1}$) интенсивности СС, КС и БС. Однако снижение активности ФС2 и P_n у мутанта *hu4*, выращенного при более высокой интенсивности СС, было заметно сильнее, чем у ДТ. При этом у мутанта с дефицитом криптохрома 2 разница в степени ингибирования фотосинтетической активности между ДТ и мутантом не обнаружена. На КС и БС растениях любой интенсивности и растениях умеренного СС не было обнаружено заметных различий между *hu4* и ДТ, обработанных СВИ. Однако растения СС высокой интенсивности, обработанные УФ-В, продемонстрировали значительную разницу в ингибирующих эффектах УФ-В на ФА между ДТ и *hu4*, однако у растений выращенных на умеренном СС разница в ингибировании фотосинтетической активности между ДТ и мутантом была заметно меньше, чем у растений СС высокой интенсивности. При этом у последних растений уровни экспрессии генов ключевых факторов транскрипции (*HYH*, *HY5*, *FHY1*, *LAF1*, *FHY3*, *HFR1*), ферментов биосинтеза каротиноидов и флавоноидов (*CHS*, *FLS1*, *PAL1*, *PSY*) и антиоксидантных ферментов (*GR*, *GP*, *APX1*) были увеличены в большей степени после облучения СВИ, чем у растений выращенных на умеренном СС. Мы предполагаем, что эта разница в устойчивости растений к СВИ или УФ-В зависит от интенсивности СС и, вероятно, связана с содержанием каротиноидов и УФ-поглощающих пигментов, которое было значительно выше у ДТ, чем у мутанта *hu4* при высоком СС, но сопоставимы у ДТ и *hu4* при умеренном СС. Была выдвинута гипотеза о наличии нового свойства криптохрома 1 – его важности для поддержания устойчивости к стрессу ФА при выращивании растений на белом свету: интенсивность света в диапазоне спектра 400–500 нм должна быть достаточно высокой. Предлагается схема, объясняющая это свойство криптохрома 1.

Работа была поддержана грантом РФФИ (№ 20-04-00512а).

1. Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L., van der Horst, G.T.J., Batschauer, A., and Ahmad, M., 2011. The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 335–364
2. Wang, Q., Lin, C., 2020. Cryptochrome-mediated photoreponses in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 71, 103–129

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ОКИСЛЕННЫХ И НЕОКИСЛЕННЫХ БИСРЕТИНОИДОВ В ЛИПОФУСЦИНОВЫХ ГРАНУЛАХ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В КЛЕТКАХ РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА

Comparative study of the phototoxic properties of oxidized and non-oxidized bisretinoids in lipofuscin granules contained in the cells of the retinal pigment epithelium of the human eye

М. А. Яковлева^{1*}, Д. С. Островский², Т. Б. Фельдман^{1,3}, А. Е. Донцов¹,
М. Х. Хубецова², С. А. Борзенко², М. А. Островский^{1,3}

1 – Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской Академии наук

2 – Межотраслевой научно-технический комплекс “Микрохирургия глаза”

им. С. Н. Фёдорова Министерства здравоохранения Российской Федерации

3 – Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

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

Известно, что с возрастом в клетках ретинального пигментного эпителия (РПЭ) глаза человека накапливаются липофусциновые гранулы (ЛГ). При развитии ряда дегенеративных заболеваний сетчатки, в частности, возрастной макулярной дегенерации, этот процесс протекает более интенсивно. ЛГ в РПЭ образуются в результате неполной лизосомальной деградации обломков наружных сегментов фоторецепторных клеток и содержат в своем составе бисретиноидные флуорофоры (Бис-Рет) – продукты модификации полностью-*транс*-ретинала. Известно, что при действии света в присутствии кислорода Бис-Рет ЛГ фотоокисляются с образованием различных продуктов, главным образом, эпоксидов, пероксидов, альдегидов и кетонов, являющихся потенциально токсичными для клетки. Ранее нами было показано, что фототоксичное действие окисленных Бис-Рет менее выражено, чем неокисленных [1]. Вместе с тем, окисленные Бис-Рет способны оказывать токсичное действие на клеточные структуры, в частности, повреждать молекулы ДНК в темноте. Более того, ранее были получены данные, указывающие на то, что при действии света происходит высвобождение продуктов фотоокисления А2Е из ЛГ в водную среду [2]. Таким образом, целью данной работы является сравнительный анализ фототоксичных свойств необлученных ЛГ, содержащих нативный состав Бис-Рет, и предварительно облученных ЛГ синим светом, с повышенным содержанием продуктов фотоокисления и фотодеградация Бис-Рет. Для проведения экспериментов использовали методы ВЭЖХ, конфокальной микроскопии, проточной цитофлуориметрии, ДНК-кометы. Исследование проводили на культуре клеток РПЭ (ARPE-19), которые предварительно нагружали или необлученными, нативным ЛГ, или облученными синим светом. Показано, что ЛГ, как нативные, так и предварительно облученные, не вызывают заметного повреждающего эффекта на клетки РПЭ сразу после облучения образцов синим светом в течение 18 часов. Однако, через 4 суток темновой адаптации наблюдается отдаленный повреждающий эффект более заметный в образцах клеток РПЭ, содержащих нативные ЛГ по сравнению с образцами, содержащими фотоокисленные ЛГ. В то же время при темновой адаптации в течение 4 суток образцов, не облученных синим светом в течение 18 часов, также наблюдается отдаленный повреждающий эффект. При этом он более выражен в образцах клеток РПЭ, содержащих фотоокисленные ЛГ. Таким образом, нативные ЛГ являются фототоксичными, а фотоокисленные ЛГ являются токсичными и в отсутствие света.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2020-773).

1. Яковлева М.А. и др. *Патогенез*, 2019, 17(1), 66–71

2. Dontsov A.E., et al. *Doklady RAS*. 2009. V. 425. P. 98–101

СЕКЦИЯ 4. ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ, ЛАЗЕРНОЙ И PUVA ТЕРАПИИ

ЭФФЕКТЫ МОДУЛЯЦИИ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК СЕРДЦА КРЫС НИЗКОИНТЕНСИВНЫМ КРАСНЫМ СВЕТОМ В УСЛОВИЯХ АДРЕНАЛИНОВОЙ АРИТМИИ Effects of modulation in rats' cardiac electrical characteristics by low-intensity red light in conditions of adrenal arrhythmia

Ольга Другова*, Анна Баврина, Светлана Малиновская, Владимир Борзиков

Приволжский исследовательский медицинский университет, г. Нижний Новгород,
пл. Минина и Пожарского, д.10/1, 603005, Россия
*e-mail: olgadrugova@gmail.com, тел.: +79056603868

К настоящему времени широкое применение в клинической практике получило использование низкоинтенсивного света красного и ближнего инфракрасного диапазона для коррекции различных патологий [1]. В частности, ряд исследований свидетельствует о модуляции электрических характеристик кардиомиоцитов красным светом [1, 2]. Однако первичные фотохимические и фотофизические превращения, вызванные поглощением световой энергии, до сих пор изучены крайне мало. Большинство современных исследователей ключевую роль в изменении физиологического состояния облучённых красным светом объектов отводят митохондриям [3], которые могут быть первичными неспецифичными фотоакцепторами и запускать каскад реакций, приводящих, в первую очередь, к изменению уровня АТФ и значительным колебаниям в динамике внутриклеточного Ca^{2+} .

В данном исследовании анализировались изменения электрических характеристик сердца крыс, обусловленные адреналиновой аритмией и эффекты их модуляции низкоинтенсивным красным светом.

Экспериментальные животные были разделены на три группы: контрольную и две опытные. Регистрацию электрических параметров сердца осуществляли с помощью ветеринарного электрокардиографа «Поли-Спектр 8В» в течение 10 мин. В контрольной группе животные не подвергались никаким воздействиям, в опытных группах моделировалась адреналиновая аритмия. В первой опытной группе регистрировалась ЭКГ по истечении 5 мин после моделирования адреналиновой аритмии. Во второй опытной группе применялась та же схема, но при этом ЭКГ регистрировалась при одновременном облучении проекционной зоны сердца светом красного светодиода (спектральный центр 650 нм), интенсивность излучения 5 мВт/см².

Адреналиновая аритмия характеризовалась статистически значимым снижением интервала QT в сравнении с контролем. При этом, было показано снижение M_o на фоне не значимо изменённой ЧСС. Воздействие красного света после аритмии способствовало возвращению продолжительности QT интервала к нормальным значениям, M_o не отклонялась от нормы. Анализ вариационного размаха показал снижение при фотомодуляции variability ритма, что предполагает SA узел, в пейсмекерной активности которого важную роль играют Са-токи, наиболее чувствительной к красному свету мишенью. Таким образом, эффекты модуляции электрических характеристик сердца красным светом обусловлены, вероятнее всего, изменением Са-динамики.

Работа была выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации РК 208.094.01 121130100281-9.

1. Heiskanen V., Pfiffner M., Partonen T. *Ageing Res. Rev.* (2020) Aug; 61:101089
2. Gregory M. Dittami, Suhrud M. Rajguru, Richard A. Lasher, Robert W. Hitchcock, Richard D. Rabbitt. *J Physiol.* 589.6 (2011), pp 1295–1306
3. Tiina Karu. *Photomedicine and Laser Surgery*, vol. 28, N2, 2010, pp. 159–160

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА НАКОПЛЕНИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА РАДАХЛОРИН В РАКОВЫХ И ПСЕВДОНОРМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ И ИХ РЕАКЦИИ НА ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ Investigation of Radachlorin photosensitizer accumulation in cancer and pseudo- normal cells and their response to photodynamic treatment

Андрей Владимирович Белашов^{1*}, Анна Александровна Жихорева¹,
Илья Константинович Литвинов², Татьяна Николаевна Беляева²,
Елена Сергеевна Корнилова², Ирина Владимировна Семенова¹,
Олег Святославович Васютинский¹

1 – Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, 194021 Санкт-Петербург, Россия
2 – Институт цитологии РАН, 194064 Санкт-Петербург, Россия
*e-mail: Belashov.Andrey.93@gmail.com, тел. +7 921 5778256

Фотодинамическая терапия (ФДТ) сегодня весьма широко используется в современной медицине для лечения многих заболеваний, в том числе для борьбы со злокачественными новообразованиями. Успешность этой процедуры зависит от большого числа факторов, среди которых можно отметить область накопления фотосенсибилизатора внутри клетки, его концентрацию, а также длительность и плотность мощности лазерного излучения, воздействующего на фотосенсибилизированную клетку [1].

В ходе этой работы нами был исследован процесс накопления фотосенсибилизатора Радахлорин в раковых клетках HeLa, A549 и псевдо-нормальных клетках 3Т3. Численный анализ распределений интенсивности флуоресценции клеток указанных линий при разной длительности их инкубации в растворе фотосенсибилизатора позволил оценить динамику накопления фотосенсибилизатора и продемонстрировать наличие небольших различий в скорости его аккумуляции в клетках разных типов. Был продемонстрирован эффект насыщения фотосенсибилизатором клеток и выход на плато кинетики накопления после нескольких часов инкубации, что косвенно свидетельствует о пассивном проникновении фотосенсибилизатора во внутриклеточную среду. Анализ пространственных распределений флуоресценции Радахлорина, и их сравнение с трехмерными распределениями показателя преломления, полученными с помощью голографической томографии [2], позволил заключить, что Радахлорин преимущественно локализуется в области концентрации мелких структур с высоким показателем преломления, в основном в непосредственной близости от ядра клеток.

Также были проведены эксперименты по одновременному наблюдению распределений флуоресценции Радахлорина, а также стандартных биологических красителей лизотрекера и митотрекера, что позволило продемонстрировать преимущественное накопление этого фотосенсибилизатора в лизосомах. Анализ реакции клеток на фотодинамическое воздействие также показал, что чувствительность указанных клеточных линий к фотодинамическому воздействию различна, что может быть связано с разным пределом накопления фотосенсибилизатора в клетках.

Работа поддержана Российским Научным Фондом (грант №21-72-10044)

1. Park Y. K., Park C. H. Clinical efficacy of photodynamic therapy // *Obstetrics & gynecology science.* – 2016. – Т. 59. – №. 6. – С. 479
2. Barty A. и др. Quantitative phase tomography // *Optics Communications.* – 2000. – Т. 175. – №. 4-6. – С. 329–336

**КАРОТИНОИД ФИТОФЛУИН – ЭФФЕКТИВНЫЙ УФ-А
ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОР ОБРАЗОВАНИЯ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА**
The carotenoid phytofluene is an effective UV-A photosensitizer for the formation of singlet oxygen

**Антон С. Бендикис¹, Александр А. Ашихмин², Андрей А. Москаленко²,
Александр А. Красновский¹**

1 – Институт биохимии имени А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071 Москва, Россия;
2 – Институт фундаментальных проблем биологии РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, Московская область, 142290, Россия;
*e-mail: phoal@mail.ru, тел. +7(495)954-14-72

Фотосинтезирующие организмы (высшие растения, водоросли и бактерии) образуют различные типы окрашенных каротиноидов, которые могут служить эффективными протекторами живых тканей, защищая их от фотоокислительного стресса. Защитные свойства каротиноидов основаны на их способности дезактивировать триплетные состояния хлорофиллов и бактериохлорофиллов, тушить синглетный кислород и нейтрализовать свободные радикалы. Известно, что неокрашенные каротиноиды с короткой системой сопряженных двойных связей (3–7 СДС) являются универсальными предшественниками в биосинтезе окрашенных каротиноидов и ксантофиллов. Ранее на основе проведенных экспериментов с ретиналом (полиеном с 6 СДС) было высказано предположение, что неокрашенные каротиноиды могут участвовать в фотообразовании синглетного кислорода [1]. Однако систематический анализ генерации синглетного кислорода такими каротиноидами не проводился.

Используя измерение фотосенсибилизированной фосфоресценции синглетного кислорода, мы исследовали возможность тушения и образования синглетного кислорода в растворах неокрашенных каротиноидов с 3–5 СДС [2]. Установлено, что фитонин (3 СДС) и фитофлуин (5 СДС) относительно слабо тушат синглетный кислород в темноте. Константа скорости тушения синглетного кислорода этими каротиноидом составила $(4 \pm 1) \times 10^6$ и $(2 \pm 0,5) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ соответственно, что на 3–4 порядка меньше, чем константа скорости контролируемых диффузией реакций. Показано, что под действием УФ-А излучения фитонин практически не генерирует синглетный кислород в аэрированных растворах, тогда как фитофлуин – каротиноид с 5 СДС в тех же условиях эффективно генерирует синглетный кислород с квантовым выходом $85 \pm 5\%$. Мы предполагаем, что благодаря высокой фотосенсибилизирующей активности, фитофлуин может быть использован в качестве эффективного фотосенсибилизатора фотохимических процессов. Кроме того, фитофлуин потенциально пригоден в качестве фотосенсибилизатора УФ-А излучения в косметологии и медицине.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук №МК-1352.2021.1.4, а также грантов РФФИ (№№ 18-0400684-а и 19-0400331-а).

1. Krasnovskii A.A., Jr. Singlet oxygen in photosynthesizing organisms // *Zhurn. Vsesoyuz. Khim. Obsch. im. D. I. Mendeleeva, (Mendeleev Chemical Journal)*. 1986, V. 31, P. 562–567
2. Ашихмин А.А., Бендикис А.С., Москаленко А.А., Красновский А.А. (мл.) Фитофлуин – эффективный фотосенсибилизатор образования синглетного кислорода под действием УФ-А излучения // *Биохимия*. 2020. Т. 85, № 7. с. 907–915

**ФОСФОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ АКТИВАЦИИ МОЛЕКУЛ
КИСЛОРОДА В АЭРОБНЫХ РАСТВОРАХ КРАСНЫМ ЛАЗЕРНЫМ
ИЗЛУЧЕНИЕМ. ВЫЯВЛЕНИЕ ФРАУНГЕФЕРОВЫХ ПОЛОС А И Б В
СПЕКТРАХ ПОГЛОЩЕННОГО РАСТВОРЕННОГО КИСЛОРОДА**
Phosphorescence analysis of activation of oxygen molecules in aerated solutions by red laser radiation. Detection of the Fraunhofer bands A and B in the absorption spectra of dissolved oxygen

**Антон С. Бендикис¹, Антон С. Козлов¹, Сергей Е. Гончаров²,
А. А. Красновский^{1*}**

1 – ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2
2 – Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе РАН, 194021, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., д. 26
*email: phoal@mail.ru, тел. +7 903 7498648.

Информация об абсорбционных свойствах растворенного кислорода необходима для понимания фоторецепторных свойств кислорода в живых тканях. Настоящая работа посвящена анализу кислородных полос в красной (600–800 нм) области спектра путем регистрации инфракрасной фосфоресценции (1270 нм) синглетного $[^1\Delta_g(0)]$ молекулярного кислорода при прямом лазерном возбуждении кислорода, растворенного в аэрированных органических растворителях, не содержащих водородных атомов. В спектрах возбуждения фосфоресценции были обнаружены два отчетливых пика при 690 и 765 нм, подобных наблюдаемым в спектрах поглощения кислорода в газовой фазе. Их интенсивность линейно зависела от мощности возбуждения и одинаково увеличивалась после продувки кислородом или в растворителях, содержащих тяжелые атомы (бром и йод). Равное время затухания фосфоресценции наблюдалось при импульсном лазерном возбуждении на длине волны 690 и 770 нм. Относительные интенсивности пиков в большинстве исследованных растворителей составляли около 1/17, как и у кислорода в атмосфере Земли. Данные свидетельствуют о том, что полоса 690 нм соответствует колебательному сателлиту 0-0 полосы поглощения 765 нм у растворенного кислорода. Определены абсорбционные коэффициенты, соответствующие максимумам этих полос. Фосфоресценцию синглетного кислорода не удавалось наблюдать при облучении с длиной волны 630 нм. Это означает, что вероятность возбуждения молекул кислорода в этой области спектра крайне мала. Таким образом, впервые получена достоверная информация об относительной интенсивности красной и темно-красной вибронных полос поглощения молекул растворенного кислорода в естественных условиях, которая важна как для спектроскопии кислорода, так и для изучения механизмов биологического и терапевтического действия лазерного излучения. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-04-00331 А).

1. A.S. Benditkis, A.S. Kozlov, S.E. Goncharov, A.A. Krasnovsky, Jr. *Proc. Int. Conf. on Laser Optics (ICLO 2018)*, IEEE Xplor Digital Library, 2018, p. 598.
2. A.A. Krasnovsky, A.S. Benditkis, A.S. Kozlov. Kinetic Measurements of Singlet Oxygen Phosphorescence in Hydrogen-Free Solvents by Time Resolved Photon Counting. // *Biochemistry (Moscow)*. 2019, vol. 84, pp. 153–163.
3. A.A. Krasnovsky, A.S. Kozlov, A.S. Benditkis. Comparison of Photodynamic Activities of Molecular Oxygen and Porphyrins. // *Macroheterocycles*. 2019, vol 12, pp. 171–180.
4. A.S. Benditkis, A.S. Kozlov, S.E. Goncharov, A.A. Krasnovsky. Detection of the Fraunhofer band B (690 nm) in the absorption spectra of oxygen in aerated solvents. // *JOSA B.*, submitted in may, 2021.

**ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО КРАСНОГО СВЕТА НА
ПОСТАРИТМИЧЕСКОЕ ИЗМЕНЕНИЕ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ КРОВИ КРЫС
Influence of low-intensity red light on post-arrhythmic changes in rats' blood
microcirculation**

Владимир Борзиков*, Светлана Малиновская, Анна Баврина, Ольга Другова

Приволжский исследовательский медицинский университет, г. Нижний Новгород,
пл. Минина и Пожарского, д.10/1, 603005, Россия
*e-mail: crovean_@mail.ru, тел.: +79991380011

Влияние различных излучений на биологические объекты является одним из ключевых направлений современной биофизики. В последнее время накопилось большое количество исследований, доказывающих биологическую и клиническую эффективность применения низкоинтенсивного красного и инфракрасного излучения. Красный свет, в частности, успешно применяется для улучшения микроциркуляции крови [1] и восстановления нарушенной функции эндотелия [2]. Кроме того, положительное влияние низкоинтенсивного лазерного излучения красного и инфракрасного диапазона показано на мозговое кровообращение, гемостаз и гемореологию [3, 4].

В настоящем исследовании изучалось влияние низкоинтенсивного красного света на изменение показателей микроциркуляции крови крыс после моделирования у них адреналиновой аритмии.

Экспериментальные животные были разделены на контрольную и опытную группы. В контрольной группе животные не подвергались никаким воздействиям, в опытной группе моделировалась адреналиновая аритмия. По истечении 5 мин, после прекращения желудочковых экстрасистол, проводился сеанс облучения светом красного светодиода (спектральный центр 650 нм), интенсивность излучения 5 мВт/см². В зависимости от зоны светового воздействия опытная группа была разделена на две серии. В первой серии облучение подводилось к области сердца, во второй – облучалась область головы, шеи и рта. Параметры микроциркуляции оценивались методом лазерной доплеровской флоуметрии с помощью анализатора «ЛАКК–02», подводимого к шейно-головной области.

После адреналиновой аритмии микроциркуляция несколько увеличилась и составила 36,7±4,6 перф. ед. по сравнению с контролем 29,4±6,2 перф. ед., однако различия оказались статистически не значимы. Фотовоздействие на область головы, шеи и рта также не показало значимого изменения уровня микроциркуляции и составило 45,9±6,8 перф. ед. к адреналин изменённому уровню в этой серии в 37,5±5,1 перф. ед. В свою очередь, облучение зоны сердца статистически значимо повысило показатель перфузии на 11,4 перф. ед. (48,5±4,2 относительно 37,1±4,6). Таким образом, увеличение уровня микроциркуляции крови излучением красного света после адреналин обусловленной аритмии связано, главным образом, с фотобиомодификацией электрофизиологических характеристик сердца.

Работа была выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации РК 208.094.01 121130100281-9.

1. Yu S.Y. et al. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, 2006; 22: 78–86.
2. Chen C.H. et al. *Scientific reports* 2017; 7: 40442
3. Баранцев Ф.Г., Баранцева Л.П., Афанасьева Ю.Ф. *Физиотерапия, бальнеология, реабилитация*, 2007; (2): 3–5
4. Фурсова Л.А., Козловская Л.Е. *ARS MEDICA*, 2009; 13(3): 132–9

**ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ПРИНЦИПЫ СОЗДАНИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ
ТРЕТЬЕГО ПОКОЛЕНИЯ НА ОСНОВЕ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ НАНОЧАСТИЦ
Fundamental principles for designing third-generation photosensitizers based on
luminescent nanoparticles**

Д. А. Гвоздев

МГУ имени М. В. Ломоносова, биологический факультет
*e-mail: danil131054@mail.ru, тел. +79853079421

Увеличение эффективности фотодинамического действия красителей для задач фотодинамической терапии является важным направлением исследований современной фотобиологии. Можно выделить два основных подхода, позволяющих повысить фотодинамическую активность красителей. Первый подход связан с получением конъюгатов фотосенсибилизатора с молекулами, обеспечивающими направленную доставку активного вещества к наиболее уязвимой мишени воздействия. Суть второго подхода заключается в увеличении поглощательной способности фотосенсибилизатора в видимой области спектра и ближнем ИК. Сделать это можно за счет образования комплексов с наночастицами. В таких комплексах наночастицы играют роль искусственного светосборщика, передавая поглощенную энергию молекуле фотосенсибилизатора безызлучательно согласно индуктивно-резонансному механизму (Forster resonance energy transfer, FRET). Мы фокусируемся на особенностях второго подхода и суммируем результаты, полученные в нашей лаборатории и мировой практике при создании гибридных комплексов фотосенсибилизатор – полупроводниковый нанокристалл с переносом энергии. Предложена процедура оптимизации дизайна гибридных комплексов и описаны параметры, оказывающие влияние на эффективность переноса энергии в таких системах.

**ПРИРОДНЫЕ ХЛОРИНЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНАЯ ПЛАТФОРМА
ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРЕПАРАТОВ С ФОТОИНДУЦИРОВАННОЙ
ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ И АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ**
**Natural chlorins as a promising platform for the creation of drugs with photoinduced
antitumor and antimicrobial activity**

М. А. Грин*, Н. В. Суворов, В. А. Погорилый, С. И. Тихонов, А. Ф. Мионов

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.+7 916 3047105

В последние годы для повышения результативности противоопухолевой терапии разрабатываются полифункциональные препараты, обеспечивающие селективную доставку активной фармацевтической субстанции (АФС) в опухоль, надежную визуализацию опухолевого очага и эффективное терапевтическое воздействие, приводящее к регрессии и некрозу опухоли. Кроме того, набирает обороты антимикробная ФДТ, с помощью которой элиминируются патогенные бактерии и биопленки, которые они образуют.

Хлорины и бактериохлорины благодаря уникальной природной структуре являются тераностиками, обеспечивая флуоресцентную навигацию опухоли и фотодинамическую терапию при облучении светом, благодаря способности генерировать активные формы кислорода. Фокусное облучение светом зоны интереса минимизирует побочные эффекты пигментов, включая кожную фототоксичность и необходимость соблюдения больными светового режима. Тем не менее, для направленной доставки фотосенсибилизатора в опухоль требуется введение дополнительных векторных молекул, обеспечивающих рецептор-опосредованный эндоцитоз ФС в опухолевые клетки.

В настоящей работе в качестве платформы для создания вышеназванных ФС использовались производные хлорофилла *a* и бактериохлорофилла *a*, к которым были присоединены ПСМА-лиганд для векторной доставки к клеткам рака предстательной железы [1]; 3-ий домен альфа-фетопротейна для доставки к клеткам различных опухолевых линий и комплексы золота (I) и олова (IV) для мишень-ориентированной внутриклеточной доставки пигментов [2]. Все предложенные таргетные препараты хлоринового ряда проявили фотоиндуцированную противоопухолевую активность, которая превысила цитотоксичность хлоринов без введенных векторных молекул. Кроме того, разработаны катионные ФС хлоринового и бактериохлоринового ряда для борьбы с патогенами различной природы.

Работа поддержана РФФИ (грант №19-03-00302).

1. N.V. Suvorov, et. al. Synthesis of PSMA-targeted 131- and 152-substituted chlorin *e6* derivatives and their biological properties // *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2018, 22, 1030–1038
2. M.A. Grin, et. al. New Derivatives of BacterioporpurinWithThiolated Au (I) Complexes: Dual Dark- and Light Activated Antitumor Potency // *Anticancer Drug Research* 2020, 20, 1

**КАРБОКСИЛАТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ОЛОВА(IV) ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОЙ
ХИМИО- И ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ**
Carboxylate tin(IV) complexes for combined chemo- and photodynamic therapy

Валерия Голодная*, Тихонов Сергей, Наталья Демчук, Михаил Грин

МИРЭА – Российский технологический университет, Институт тонких химических технологий

*e-mail: sonea_g@mai.ru, тел. +7 9151343799

Целью работы являлся синтез потенциальных агентов для комбинированной терапии, совмещающей химиотерапию и ФДТ, на основе конъюгатов оловоорганических соединений (ООС) с фотосенсибилизаторами (ФС). ООС приводят к нарушению функций важных внутриклеточных макромолекул (ДНК, белков) и энергетического обмена в митохондриях, взаимодействуют с клеточными мембранами, увеличивая концентрацию Ca^{2+} в цитоплазме [1–2]. Данные соединения обладают высокой антипролиферативной активностью в отношении большого числа различных раковых клеток ввиду отсутствия резистентности к ним и селективного накопления, при этом их токсичность значительно ниже используемых препаратов на основе металлокомплексов.

В данной работе была разработана методика получения комплексов ди- и тризамещенного олова(IV) на основе таких аминокислот, как лизин (BocLys) и *p*-аминобензойная кислоты (РАВА) и получены конъюгаты с дипропоксикариопурпуринимидом (DPBP). Был осуществлен докинг в отношении следующих клеточных мишеней: ДНК, тубулин, тиоредоксин и тиоредоксин-редуктаза. Структура полученных соединений была подтверждена с помощью таких методов ФХМА, как ЯМР-, ИК-, масс-спектроскопия. Для расчета молекулярного докинга и визуализации результатов были использованы программы Hex 8.0.0., Chimera 1.15., BIOVIA Discovery Studio Visualizer.

Таким образом, был синтезирован ряд новых конъюгатов на основе ООС, а также описаны их физико-химические свойства и энергии связывания с потенциальными рецепторами.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-03-00302.

1. Christina N. Banti, Sotiris K. Hadjikakou, Tuba Sismanoglu, Nick Hadjiliadis. Anti-proliferative and antitumor activity of organotin (IV) compounds. An overview of the last decade and future perspectives // *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2019. Vol. 194. P. 114–152
2. Mustafa Ali, Emad Yousif. Chemistry and Applications of Organotin (IV) Complexes: A Review // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2016. Vol.7. P. 2611–2619

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ГЕНЕРАЦИИ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА И ФОТОВЫЦВЕТЕНИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА РАДАХЛОРИН НА РАЗНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПОВЕРХНОСТЯХ
Investigation of the processes of singlet oxygen generation and photobleaching of the photosensitizer Radachlorin on various biological surfaces

**А. А. Жихорева^{1*}, А. В. Белашов¹, М. Л. Гельфонд², И. В. Семенова¹,
 О. С. Васютинский¹**

1 – ФТИ им. А. Ф. Иоффе, Санкт-Петербург, 194021, Политехническая, 26

2 – НИИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова, Санкт-Петербург, 197758, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68

*e-mail: anna_zhikhoreva@mail.ru, тел. +7 950 0193618

Фотодинамическая терапия активно применяется для лечения широкого класса онкологических [1], антибактериальных [2] и вирусных заболеваний. В ходе терапии одним из способов доставки фотосенсибилизатора (ФС), который при облучении запускает процесс генерации активных форм кислорода, является напыление молекул ФС в виде аэрозоля на поверхность слизистой оболочки ротовой полости и верхних дыхательных путей. В рамках этой работы были исследованы процессы генерации синглетного кислорода, а также фотообесцвечивания молекул ФС Радахлорина при указанном подходе его доставки для ФДВ.

Аэрозоль водного раствора ФС Радахлорин генерировалась с помощью стандартного небулайзера MED2000, струя аэрозоля направлялась на различные типы поверхностей, где производилась фотосенсибилизированная генерация синглетного кислорода. Время-разрешенные сигналы фосфоресценции синглетного кислорода на разных поверхностях регистрировались с помощью фотоэлектронного умножителя Hamamatsu H10330B-45, работающего в инфракрасном диапазоне в режиме счета фотонов. Для регистрации нужного диапазона длин волн, выделялась область спектра шириной 10 нм с центральной длиной волны 1274 нм. В ходе исследования процесса фотообесцвечивания производилось наблюдение зависимости интенсивности флуоресценции ФС Радахлорин, нанесенного на различные типы поверхностей от времени, при непрерывном воздействии лазерного излучения на длине волны 405 нм при плотности мощности 141 мВт/см². В ходе этих экспериментов кинетика фотообесцвечивания наблюдалась для пяти типов поверхности: стекла, фасциальной ткани рыбы и курицы, поверхности листа и внутренней поверхности кожицы гриба.

Было продемонстрировано наличие синглетного кислорода в струе аэрозоля ФС при его освещении лазерным излучением на длине волны 405 нм. Были определены времена генерации синглетного кислорода и время его жизни в возбужденном состоянии на биологических поверхностях и стекле. Не наблюдается сильной вариации обоих времен сигнала фосфоресценции для всех исследуемых образцов, что свидетельствует об относительно неизменном времени жизни синглетного кислорода на различных поверхностях. Было установлено, что временные характеристики процесса фотообесцвечивания могут значительно отличаться в зависимости от рода и структуры поверхности, на которую аэрозолем производится напыление ФС, однако времена генерации и жизни синглетного кислорода при этом остаются практически неизменными.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ в рамках научного проекта № 21-72-10044.

1. Triesscheijn, Martijn, et al., *The oncologist*. 2006. 11(9). 1034–1044

2. Durantini, E N., *Current Bioactive Compounds*. 2006. 2(2). 127–142

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ И ИММУНОГЕННЫЕ МЕХАНИЗМЫ УСИЛЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ЦИАНОАРИЛПОРФИРАЗИНОВ В КАЧЕСТВЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ ФДТ
Metabolic and immunogenic mechanisms enabling to enhance therapeutic effect of cyanoarylporphyrines as photosensitizers of PDT

**Лариса Клапшина¹, Светлана Лермонтова¹, Татьяна Любова¹,
 Елена Ладиллина¹, Илья Григорьев¹, Наталья Шилигина², Ирина Балалаева²,
 Дмитрий Крысько^{2,3,4}**

1 – Институт металлоорганической химии Российской академии наук (ИМХ РАН), Нижний Новгород, Россия

2 – Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

3 – Ghent University, Ghent, Belgium

4 – Cancer Research Institute Ghent, Ghent, Belgium

Одним из подходов к решению проблемы резистентности онкологических заболеваний к различным видам терапии является поиск такого агента противораковой терапии, который был бы также способен быть ингибитором метаболических механизмов выживания раковых клеток в условиях окислительного стресса. Уникальные структурные особенности цианоарилпорфиразинов, являющихся эффективными фотосенсибилизаторами для ФДТ, позволяют надеяться на возможность такого двойного использования, поскольку периферийное обрамление этих макроциклов целиком состоит из диполярных структурных элементов типа D-π-A (где D- ароматический π-донор, A- электронодефицитная CN группа, а π – двойная связь, конъюгирующая донорную и акцепторную группы). «Электрофильный» характер обрамления агента терапии обуславливает высокую вероятность его химического взаимодействия с внутриопухолевыми биотиолами (цистеином, глутатионом, а также связанными с ними ферментами), необходимыми для выживания раковых клеток. Именно они, как известно, являются ключевыми факторами репрограммированных в результате онкогенеза метаболических процессов, позволяющих раковым клеткам выживать даже в условиях предельно жесткого терапевтического воздействия. Действительно, проведенный нами анализ продуктов взаимодействия порфиразинов с цистеином с использованием разнообразных спектральных методов и масс-спектрометрии (MALDI), а также исследование модельных реакций трицианоэтиленов (структурных единиц макроциклов) с простыми тиолами, подтвердили наши предположения о химическом блокировании тиольных групп электрофильными фрагментами обрамления макроциклов.

Недавно было показано, что цианоарилпорфиразины являются индукторами различных видов иммуногенной клеточной смерти в процессе ФДТ [1]. В соответствии с последними литературными данными это также может быть связано с истощением цистеина под действием молекул-электрофилов, к которым относятся разработанные нами макроциклы-фотосенсибилизаторы. С учетом многофункциональности этого жизненно важного биотиола как источника питания клеток, регулятора фолдинга протеинов и важнейшего компонента ферментативного биосинтеза глутатиона, способного поддерживать редокс-баланс внутри опухоли, нельзя исключать причастности цистеина к механизмам индукции иммуногенной гибели раковых клеток [2].

Авторы выражают благодарность Российскому научному фонду, грант № 18-15-00279 <https://rscf.ru/project/18-15-00279/> за финансовую поддержку.

1. V.D. Turabanova, et al. *Sci Rep* 2021, 11(1): 7205. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86354-4>.

2. B. Daher, et al. *Frontiers in Oncology*, 2020, 10: 722. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00723>.

**ИССЛЕДОВАНИЕ АБСОРБЦИОННЫХ СВОЙСТВ МОЛЕКУЛЯРНОГО
КИСЛОРОДА В ДИАПАЗОНЕ 810–1080 НМ В АЭРОБНЫХ
РАСТВОРАХ ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ**

**Investigation of the absorption properties of molecular oxygen in the spectral range
of 810–1080 nm in aerated solvents under physiological conditions**

**Антон С. Козлов¹, Ольга Н. Егорова², Олег И. Медведков²,
Александр А. Красновский^{1*}**

1 – ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2

2 – ФИЦ «Институт общей физики им. А. М. Прохорова РАН», 119991, г. Москва,
ул. Вавилова, д. 38

*e-mail: phoal@mail.ru, тел. +7 903 7498648

Впервые надежно измерена полоса поглощения молекулярного кислорода, соответствующая его вибронному переходу (${}^1\Delta_g(1) \rightarrow {}^3\Sigma_g^-(0)$) (1070 нм), в аэробных (насыщенных воздухом) органических растворителях при естественных физиологических условиях. Данные получены с помощью набора диодных и волоконных ИК лазеров, при этом использовали кюветы с длиной оптического пути 1 см. Скорость генерации синглетного кислорода при возбуждении кислородных молекул лазерным излучением измеряли с помощью химической ловушки синглетного кислорода – 1,3-дифенилизобензофурана. В качестве растворителей использовали четыреххлористый углерод, гексафторбензол и хладон-113. Установлено, что во всех растворителях в спектрах действия окисления ловушки, кроме ранее описанной полосы 1273 нм, обнаруживается четко выраженная полоса с максимумом 1070 нм и полушириной около 10 нм. Показано, что коэффициенты поглощения при 1070 нм во всех средах в 100–110 раз меньше, чем в максимуме основной полосы поглощения кислорода (1273 нм), соответствующей переходу, происходящему без изменения колебательной энергии (${}^1\Delta_g(1) \rightarrow {}^3\Sigma_g^-(0)$). Добавление тушителя синглетного кислорода – ацетона приводило к одинаковому уменьшению скорости выцветания ловушки под действием лазеров 1070 и 1273 нм. При действии ИК излучения в диапазоне 810–1061 нм скорость выцветания химической ловушки во всех средах была еще более низкой, причем она почти не зависела от длины волны возбуждения и лишь немного превышала скорость фонового выцветания в отсутствие облучения. В частности, мы не наблюдали достоверного усиления выцветания при действии лазеров 810 и 920 нм, соответствующих электронно-колебательным переходам на второй и третий колебательные уровни синглетного ${}^1\Delta_g$ -состояния кислорода (${}^1\Delta_g(3,2) \rightarrow {}^3\Sigma_g^-(0)$). Отсюда следует, что величина коэффициентов поглощения, соответствующих данным переходам, гораздо меньше, чем у перехода при 1070 нм. Полученные результаты важны как для спектроскопии молекулярного кислорода, так и для изучения механизмов биологического и терапевтического действия лазерного излучения. Результаты данной работы опубликованы в статье [1].

Работа была частично поддержана грантом РФФИ № 19-04-00331 А и госзада-нием ФИЦ Биотехнологии РАН.

1. A.S. Kozlov, O.N. Egorova, O.I. Medvedkov, A.A. Krasnovsky, Jr. Activation of oxygen molecules by 1070 nm laser radiation in aerated solvents. // *Optics Letters*. 2021, vol. 46, №3, pp. 556–559, doi: 10.1364/OL.416416.

**ВЛИЯНИЕ ПРЯМОЙ АКТИВАЦИИ ГЛАВНЫХ АБСОРБЦИОННЫХ ПОЛОС
КИСЛОРОДА НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОЛИКА**
**Influence of the direct activation of the main absorption bands of molecular oxygen
on the phagocytic activity of rabbit leucocytes**

**Антон С. Козлов¹, Олег Б. Любичкий², Александр А. Красновский^{1*},
Анатолий Н. Осипов²**

1 – ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2

2 – ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, г. Москва,
ул. Островитянова, д. 1

*e-mail: phoal@mail.ru, тел. +7 903 7498648

В настоящее время обсуждается возможность применения темно-красных и ИК лазеров в беспигментной фототерапии рака. Предполагают, что терапевтический эффект определяется синглетным кислородом (СК), который образуется в результате прямого лазерного возбуждения главных полос поглощения растворенных кислородных молекул (765 и 1273 нм). Проведенные нами ранее эксперименты показали, что в модельных системах генерация СК путем прямого возбуждения кислорода, растворенного при комнатной температуре и атмосферном давлении, приводит к окислению ряда соединений-акцепторов (1,3-дифенилизобензофуран, мочевиная кислота, тетрацен и др.) в различных органических растворителях и воде как с детергентами, так и без детергентов. Однако при сопоставимой мощности возбуждающего излучения эффективность этого процесса на несколько порядков ниже, чем при фотосенсибилизированной генерации СК. Тем не менее, имеются данные о том, что СК, образующийся при прямом возбуждении кислородных молекул в опухолевых клетках, может вызывать их гибель. Одним из факторов беспигментной лазерной терапии может быть изменение состояния клеток иммунной системы, вызванное образованием СК. В связи с этим мы исследовали воздействие лазерного излучения (766 и 1269 нм) на фагоцитарную активность лейкоцитов кролика, которую оценивали методом активированной трипептидом fMLP (формил-метилонил-лейцил-фенилаланин) хемилюминесценции (АХЛ) при окислении люминола. О величине активности лейкоцитов судили по интенсивности пика кинетических кривых АХЛ. Показано, что действие лазера с длиной волны излучения 1269 нм вызывает зависимое от дозы облучения снижение активности лейкоцитов. Однако известно, что темно-красное и особенно ИК излучение поглощается не только кислородом, но и самой водой, вызывая ее нагревание. С целью выявления относительного вклада лазерной активации кислорода и теплового эффекта в снижение активности лейкоцитов было проведено сравнение действия на клетки излучения лазеров и простого нагревания среды с таким же повышением температуры, которое происходило при облучении. Показано, что при действии ИК лазера ингибирование лейкоцитов было выражено несколько сильнее, чем при нагревании в отсутствие излучения. Кроме того, форма кинетических кривых АХЛ при указанных воздействиях была различна. При действии же лазера с длиной волны излучения 766 нм нагревание было заметно меньше, чем при использовании ИК лазера, но при этом и ингибирование лейкоцитов при облучении было почти таким же, как и при простом нагревании среды. Эти результаты показывают, что основная часть воздействия на лейкоциты кролика от излучения лазеров на 766 и 1269 нм является термической и только небольшая его часть (не более 20%) может быть связана с прямой генерацией СК.

Работа была частично поддержана грантом РФФИ № 19-04-00331 А и госзада-нием ФИЦ Биотехнологии РАН.

КАТИОННЫЕ ПОРФИРИНЫ С ФОСФОРОМ (V): ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ НА АДСОРБЦИЮ И ФОТОДИНАМИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ НА БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ
Cation phosphorus (V) porphyrines: the influence of structure on adsorption and photodynamic efficiency on bilayer lipid membranes

А. Н. Константинова^{1*}, И. Именес-Мунгуя¹, А. К. Федоров¹, К. И. Макринский¹, Ю. А. Ермаков¹, И. Н. Мешков¹, Ю. Г. Горбунова^{1,2}, В. С. Соколов¹

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

² – Институт общей и неорганической химии им. Н. С. Курнакова РАН Москва, Россия

*email: anna.n.gavrilchik@gmail.com, тел: +79167577756

Развитие метода фотодинамической терапии сопряжено с поиском и направленным синтезом новых фотосенсибилизаторов (ФС), а также с разработкой методов оценки их эффективности. Использованная в данной работе оригинальная методика оценки эффективности ФС основана на измерении разности граничных потенциалов $\Delta\phi$ бислойной липидной мембраны (БЛМ), являющейся моделью клеточной мембраны. Изменение граничного потенциала мембраны при адсорбции порфиринов было измерено двумя методами: методом компенсации внутримембранного поля (КВП) и по изменению проводимости БЛМ, индуцированной нонактином. Полученные значения $\Delta\phi$ сравнивались со значениями ζ -потенциала липосом с адсорбированными на них молекулами ФС. С помощью такой методики были изучены адсорбция и фотодинамическая эффективность катионных порфиринов с фосфором (V), различающихся числом периферийных пиридиновых заместителей и структурой аксиального лиганда: гидроксильный (ОН) или этиловый (ОEt).

Изменение $\Delta\phi$ на БЛМ не регистрировалось в случае порфиринов, не имеющих периферийных пиридиновых групп. В случае соединений с пиридиновыми заместителями сравнение значений $\Delta\phi$, измеренных методами КВП и с нонактином, позволило установить, что порфирины, имеющие аксиальные лиганды ОН, проникают сквозь мембрану, в отличие от порфиринов с этиловыми лигандами. Значения $\Delta\phi$ значительно превышали ζ -потенциалы, в связи с чем был сделан вывод, что заряженные группы порфиринов при адсорбции погружаются в мембрану, т.е. эти молекулы встраиваются в БЛМ.

Фотодинамическая активность порфиринов изучалась с помощью измерения скорости разрушения встроенных в мембрану молекул-мишеней синглетного кислорода – стироловых красителей di-4-ANEPPS в присутствии ФС методом КВП [1]. Скорость разрушения определялась по кинетике изменения $\Delta\phi$ при освещении мембраны с адсорбированными на ней молекулами порфиринов и di-4-ANEPPS. Исследование осложнялось в связи с саморазрушением ФС, адсорбированных на мембрану, приводящим также к изменению $\Delta\phi$. Данный процесс был учтен путем измерения потенциала адсорбции ФС при освещении БЛМ. Разрушение мишеней регистрировалось в присутствии всех порфиринов, включая ФС, не имеющих боковые пиридиновые заместители. Данный факт свидетельствует о том, что ФС без пиридиновых заместителей также способны адсорбироваться на мембране, не изменяя при этом $\Delta\phi$. Установлено, что порфирины с этиловой аксиальной группой обладали большей фотодинамической активностью, чем порфирины с гидроксильной группой, что объяснено погружением ФС с этиловой группой в мембрану на большую глубину.

Работа поддержана проектом РНФ № 19-13-00410.

1. Sokolov V. S. et al. Voltage-sensitive styryl dyes as singlet oxygen targets on the surface of bilayer lipid membrane // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* – 2016. – Т. 161. – С. 162–169

ИНАКТИВАЦИЯ БАКТЕРИЙ *SALMONELLA TYPHIMURIUM* И *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* В РАСТВОРАХ И БИОПЛЕНКАХ В ПРИСУТСТВИИ СЕНСИБИЛИЗАТОРОВ
Inactivation of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* bacteria in solutions and biofilms in the presence of sensitizers

Сергей Летута, Азамат Ишемгулов, Дмитрий Раздобреев, Юрий Лантух, Эскендер Алиджанов

ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», г. Оренбург

*e-mail: letuta@com.osu.ru

Изучены механизмы инактивации бактерий в растворах и биопленках при совместном действии наносекундных импульсов лазерного излучения видимого диапазона и органических фото- и термосенсибилизаторов.

Объектами исследования служили штаммы *Salmonella typhimurium* LT2 и *Staphylococcus aureus*. В качестве сенсибилизаторов целенаправленно выбраны красители эритрозин и родамин С, кардинально отличающиеся свойствами. Ксантовый краситель эритрозин – анион, обладает высоким (близким к единице) квантовым выходом в триплетное состояние, очень эффективный фотосенсибилизатор (ФС) активных форм кислорода (АФК). Родамин С катион, квантовый выход в триплетное состояние близок к нулю, не является ФС. Источником возбуждения служил импульсный YAG:Nd лазер LQ-215 (SolarLS). Параметры импульса: длина волны $\lambda = 532$ нм, длительность 10 нс, плотность мощности возбуждения регулировалась в пределах 0.1–30 МВт/см². Размеры частиц и их распределения по размерам определяли методом динамического рассеяния света с помощью наносайзера Photocor и программы DynaLS. Характер повреждения бактерий и изменения их топографии оценивали по изображениям, полученным с помощью атомно-силового микроскопа CSM – 2000.

В зависимости от типа красителя и характера его взаимодействия с микроорганизмами, изучены следующие механизмы инактивации бактерий:

- фотодинамическое повреждение клеток АФК;
- разрушение клеток или внутриклеточных элементов ударными волнами, образующимися при быстром локальном нагреве среды в ходе безызлучательной релаксации высоковозбужденных электронных состояний (ВВЭС) молекул;
- локальная гипертермия, обусловленная превращением поглощенной световой энергии в тепло молекулами (термосенсибилизаторами), связанными со стенками бактерий или находящимися внутри клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России, проект № FSGU-2020-0003.

**КОНЬЮГАТЫ СОЕДИНЕНИЙ ПОРФИРИНОВОГО РЯДА С ПРОИЗВОДНЫМИ
ТЕРПИРИДИНА КАК ПЕРСПЕКТИВНАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ
ТЕРАНОСТИКОВ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ**
Conjugates of the compounds of the porphyrin series with terpyridine derivatives as
a promising platform for a broad spectrum theranostic production

А. Ф. Миронов

МИРЭА-Российский технологический университет, Москва, пр.Вернадского, 78

*e-mail: mironov@mitht.ru, тел. +79032704105

Порфирины и их ди- и тетрагидропроизводные широко используются в качестве фотосенсибилизаторов в фотодинамической терапии рака. Однако по мере перехода от порфиринов к хлоридам и далее к бактериохлоридам существенно снижается их флуоресценция, что затрудняет обнаружение и диагностику злокачественных новообразований. Одним из перспективных направлений в создании эффективных тераностиков на основе порфиринов является синтез их конъюгатов с производными терпиридина. Последние хорошо образуют комплексы с металлами в широком диапазоне ионных радиусов, включая крупные лантаноидные элементы. Это открывает возможности для создания набора тераностиков, в котором порфирины, хлорины и бактериохлорины генерируют синглетный кислород и другие активные радикалы, а металлокомплексы терпиридина позволяют в зависимости от природы присоединенного металла осуществлять флуоресцентную диагностику и другие методы обнаружения и визуализации опухолей (МРТ, ПЭТ и др.). Подобный подход позволяет также дополнить ФДТ рака химиотерапевтическим воздействием при включении в конъюгат таких онкопрепаратов, как цисплатин и другие платиносодержащие соединения.

Будут рассмотрены работы по синтезу и изучению свойств порфиринов-терпиридиновых конъюгатов, выполненные в последние годы, а также собственные исследования в данной области.

Работа поддержана грантом РФФИ №21-13-00078.

**ПОТЕНЦИАЛ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФИТОПРЕПАРАТОВ В
КАЧЕСТВЕ НАТУРАЛЬНЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ ДЛЯ
АНТИМИКРОБНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ**
Potential of phytopreparations as natural photosensitizers for antimicrobial
photodynamic therapy

**Александр Микулич, Антонина Третьякова, Татьяна Ананич,
Роман Нагорный*, Игорь Леусенко, Людмила Плавская, Валерий Сысов,
Ольга Дудинова, Виталий Плавский**

Институт физики НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

*e-mail: r.nagorny@ifanbel.bas-net.by, тел. +375 29 130 19 49

Одним из активно развиваемых подходов по преодолению устойчивости патогенной микрофлоры к действию лекарственных препаратов, является антимикробная фотодинамическая терапия (АФДТ) – биофотонная технология, основанная на сочетании использования фотоактивного соединения (фотосенсибилизатора), селективно накапливающегося в клетках патогенов, и оптического излучения, соответствующего спектру поглощения указанного соединения.

В настоящей работе с целью выяснения возможности использования в качестве фотосенсибилизаторов для антимикробной фотодинамической терапии исследованы спектрально-люминесцентные свойства, а также фотосенсибилизирующая активность препаратов на основе экстрактов лекарственных растений.

В качестве объектов исследования были выбраны лекарственные препараты растительного происхождения: препарат, представляющий собой жидкий экстракт из смеси цветков ромашки аптечной, цветков календулы лекарственной, травы тысячелистника обыкновенного на 65% спирте; препарат из листьев эвкалипта прутовидного на 64% спирте; препарат на основе травы зверобоя на 65% спирте. Спектры поглощения лекарственных препаратов регистрировались на спектрофотометре UV-VIS PB 2201 (Солар, Республика Беларусь). Измерения спектров флуоресценции и возбуждения флуоресценции производили на спектрофлуориметре SM 2203 (Солар, Республика Беларусь). С целью исключения экранирования излучения при записи спектров флуоресценции оптическая плотность растворов (D) не превышала $D = 0,1-0,2$ на длинах волн возбуждения и регистрации флуоресценции. О фотосенсибилизирующей активности препарата судили по эффективности генерации им синглетного кислорода.

На основании исследования абсорбционных и спектрально-флуоресцентных свойств препаратов определены компоненты, способные оказывать фотосенсибилизирующее действие. Показано, что определяющий вклад во флуоресценцию при возбуждении в видимой области спектра вносят: хлорофиллы a и b – для препарата из листьев эвкалипта, для жидкого экстракта из смеси цветков ромашки аптечной, цветков календулы лекарственной, травы тысячелистника обыкновенного; хлорофиллы a и b , и гиперин – для препарата на основе травы зверобоя. При этом вклад хлорофилловой и гипериновой компонент зависит от длины волны воздействующего излучения. Результаты исследований эффективности генерации синглетного кислорода (1O_2) показывают, что квантовый выход генерации 1O_2 для препарата из листьев эвкалипта является высоким и составляет $\gamma_{\Delta} = 0,30$. Фотодинамическое действие препарата на основе травы зверобоя характеризуется $\gamma_{\Delta} = 0,22$.

Таким образом, все исследованные препараты могут выступать в качестве фотодинамически активных соединений для АФДТ.

Работа поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (грант №Ф21ВТНГ-001).

ПРИРОДНЫЕ ХЛОРИНЫ КАК ПЛАТФОРМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ХИМИОТЕРАПИИ И ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ
Natural chlorines as a platform for creating drugs for combined chemotherapy and photodynamic therapy

Петр Островерхов*, Никита Кирин, Светлана Степанькова,
 Анастасия Шелягина, Дарья Петрова, Евгения Ростиашвили, Михаил Грин

МИРЭА - Российский технологический университет, Институт тонких химических технологий им. М.В.Ломоносова, 119571, Россия, Москва, пр-кт Вернадского, 86
 *e-mail: ostroverhov@mirea.ru, тел. +7 985 9727069

На сегодняшний день одним из самых перспективных методов лечения рака является таргетная терапия. И одним из самых эффективных и в то же время безопасных видов не только лечения, но и диагностирования злокачественных новообразований на ранних стадиях является фотодинамическая терапия (ФДТ). Как правило, в ФДТ используются специальные агенты – фотосенсибилизаторы (ФС) – вещества, которые обладают выраженными фотофизическими, фотохимическими свойствами, а именно: поглощением в видимой и ближней инфракрасной области спектра, высоким значением выхода синглетного кислорода, способностью флуоресцировать при воздействии света, а также способностью накапливаться в организме человека в различных органеллах. Всем перечисленным выше требованиям удовлетворяют природные и синтетические вещества порфириновой структуры [1].

Таковыми агентами служит широкий спектр производных природных хлоринов, которые и применяются в основном в качестве ФС для ФДТ. Мишени, то есть прямое действие на клетки, действие на активность ферментов, действие на ионные каналы ткани, действие на рецепторы, на которые действуют и в которых накапливаются ФС, так же напрямую связаны с их структурой. И сейчас основная задача, состоит в том, чтобы создать ФС, нацеленный на конкретную из приведенных мишеней в микроокружении опухоли, который при активации с помощью облучения светом определенной длины волны приведет к гибели злокачественного новообразования по одному из механизмов: антиангиогенному (предотвращающему метастазирование опухолевых клеток, разрушая их систему кровеносных сосудов) или некротическому. И для такой объемной, комплексной задачи создаются производные природных хлоринов и бактериохлоринов с различными фармакоформными группами, которые способны как целенаправленно накапливаться около опухолевого узла, так и обладать определенной биологической активностью помимо фотоиндуцированной цитотоксичности, выделением АФК, за счет чего получается вызвать гибель опухоли.

Также на сегодняшний момент осуществляется поиск перспективных ФС для бинарной терапии рака, в котором бы сочетались несколько подходов к лечению онкологических заболеваний и что повышало бы эффективность такой терапии в борьбе со злокачественными новообразованиями.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-33-90262 Аспиранты.

1. Mokhtari et. al. Combination therapy in combating cancer. / Mokhtari, Reza Bayat, Homayouni, Tina S, Baluch, Narges, Morgatskaya, Evgeniya, Kumar, Sushil, Das, Bikul, Yeager, Herman. // *Oncotarget, Impact Journals*, LLC – 2017 – Vol.8 №23 – P. 38022–38043 <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16723>

ФОТОАКЦЕПТОРЫ И ФОТОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ РЕГУЛЯТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ВИДИМОЙ ОБЛАСТИ СПЕКТРА НА КЛЕТКИ ЭУКАРИОТ, ПРОКАРИОТ И СПЕРМАТОЗОИДЫ
Photoacceptors and photochemical mechanisms that determine the regulatory effect of optical radiation in the visible region of the spectrum on eukaryotic, prokaryotic and sperm cells

Виталий Плавский*, Антонина Третьякова, Людмила Плавская, Александр Микулич, Татьяна Ананич, Ольга Дудинова, Юлия Крученок, Андрей Собчук, Игорь Леусенко, Валерий Сысов, Николай Барулин, Николай Сердюченко

Институт физики НАН Беларуси
 *e-mail: v.plavskii@ifanbel.bas-net.by, тел. +37517447196751

Интерес к выяснению механизма фотобиомодуляции продолжает оставаться высоким ввиду отсутствия значительного прогресса в понимании процессов, определяющих эффекты регуляторного действия света. При этом в литературе появилось ряд данных, ставящих под сомнение возможную роль цитохром-с-оксидазы как возможного акцептора, ответственного за реализацию регуляторного действия света. В этой связи наши исследования направлены на выявление молекул, способных при поглощении света влиять на метаболические процессы в клетке. Исследования выполнялись на различных типах клеток: эукариот, прокариот, клетках крови (эритроцитах), сперматозоидах. При этом мы исходили из следующих предположений: а) в основе регуляторного действия света лежит изменение окислительно-восстановительного статуса клеток, инициируемое образованием активных форм кислорода (АФК) в результате возбуждения эндогенных фотосенсибилизаторов; б) фотосенсибилизаторами в клетке выступают флуоресцирующие соединения, концентрация которых достаточно низкая, чтобы исключить протекание выраженных деструктивных процессов. Для обнаружения указанных сенсбилизаторов нами разработана специальная методика, позволяющая с помощью флуоресценции выявить наличие в клетках очень низких концентраций люминофоров (менее 0,01 мкМ).

Выполненные исследования показали наличие во всех типах клеток присутствие эндогенных фотосенсибилизаторов порфиринового (копро-, уро-, протопорфирин) и флавинового (флавинадениндуклеотид, ФАД и флавиномонуклеотид, ФМН) рядов, поглощающих излучение видимой области спектра и сенсбилизующих образование АФК (главным образом синглетного кислорода). Доказательства участия АФК в реализации эффектов фотобиомодуляции получены с использованием люминол-зависимой хемилюминесценции и тушителей АФК. Наиболее выраженное образование АФК наблюдается при воздействии излучения синей области спектра, соответствующей максимумам поглощения порфиринов (полоса Core, 405–410 нм) и флавинов (445 нм). При добавлении к клеткам перед их облучением тушителя синглетного кислорода азид натрия, сигнал хемилюминесценции значительно снижается. Вместе с тем важную роль в изменении функциональной активности клеток в культуре играет перекись водорода: добавление тушителя перекиси (пирувата натрия) фактически блокирует фотобиологический эффект. Характерно, что зависимость выживаемости клеток животных от энергетической дозы представляет собой типичную двухфазовую кривую, описываемую известным законом Арндта-Шульца: при малых дозах живой организм отвечает на воздействие стимуляцией; по мере возрастания дозы стимулирующий эффект достигает максимума, затем сменяется угнетением, а при дальнейшем увеличении дозы – гибелью организма. Таким образом, фотовозбуждение эндогенных сенсбилизаторов способно изменять окислительно-восстановительный статус клеток и влиять на протекание метаболических процессов. В зависимости от концентрации АФК воздействие света может приводить как к стимуляции клеточных процессов, так и к их угнетению, а также инициировать летальный исход.

Исследования были поддержаны Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (грант Ф21В-003).

**ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ БЕНГАЛЬСКОГО РОЗОВОГО НА
ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ ПРУДОВИКА**
Photodynamic effect of Rose Bengal on the electrical activity of molluscan neurons

Л. Б. Попова*, Е. А. Котова, Ю. Н. Антоненко

НИИ физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского МГУ
имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия
*e-mail: lala@belozersky.msu.ru, тел. +7 977 662 0231

Фотодинамическая терапия занимает важное место в системе противораковых и других лечебных воздействий. Однако остается еще много вопросов о механизмах действия фотосенсибилизаторов на живые ткани. Удобной моделью для изучения фотодинамического воздействия на электрическую активность нейронов является нервная система моллюсков. Ранее [1] нами было показано, что освещение изолированных ганглиев моллюска в присутствии классического фотосенсибилизатора бенгальского розового приводит к быстрой деполаризации плазматической мембраны, увеличению частоты спайков и, в конечном итоге, к подавлению электрической активности нейронов. В дальнейшем мы детально исследовали фотодинамическое воздействие красителя бенгальского розового, известного своим высоким квантовым выходом генерации синглетного кислорода, на электрическую активность нейронов моллюска *Lymnaea stagnalis*, уделив особое внимание фотосенсибилизированной модификации электрических связей между клетками. Электрические контакты широко представлены в различных животных тканях. В нервных тканях электрические контакты вносят существенный вклад в организацию нервных сетей, в синхронную работу нейронов, в генерацию ритмической активности. Описано несколько классов электрических контактов, которые, однако, имеют похожее строение. Электрические контакты, пронизываемые для небольших молекул, сформированы двумя полуканалами, расположенными напротив друг друга в соседних клетках. Проводимость каналов зависит от концентрации ионов Са, рН и температуры. Показано обратимое нарушение электрической связи между нейронами под действием перекиси водорода [2]. Однако данные о фотодинамическом повреждении электрических контактов между нервными клетками нам не известны. В качестве модельного объекта для исследования этого вопроса мы выбрали две пары идентифицированных нейронов моллюска *Lymnaea stagnalis*, LCGC/RCGC и VD1/RPaD2, электрические контакты между которыми хорошо изучены. Для этих пар нейронов характерна высокая синхронность спайковой активности. Известно, что она обеспечивается электрическими связями [3, 4]. В наших экспериментах при освещении белым светом на фоне бенгальского розового в течение 1–3 мин синхронность в работе нейронных пар нарушалась. В паре LCGC/RCGC коэффициент электрической связи колебался от 0,03 до 0,09 и в среднем был равен 0,054. При добавлении в омывающий раствор бенгальского розового в темноте связь существенно не менялась. При освещении она уменьшалась в среднем до 0,028. Это приводило к асинхронности в генерации спайков. Коэффициент связи в паре VD1/RPaD был на порядок больше, чем в паре LCGC/RCGC, что объясняется анатомией этих клеток. Коэффициент колебался от 0,5 до 0,8, и в среднем был равен = 0,65. При освещении на фоне бенгальского розового он падал до 0,2 в течение 2–4 минут. Таким образом, нам удалось показать, что при фотодинамическом воздействии на нейроны происходит нарушение работы электрических синапсов.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант №21-14-00062)

1. doi: 10.1134/S0006297919100043; 2. doi: 10.1007/s10158-012-0128-7; 3. PMID: 6154759;
4. doi: 10.1016/j.brainres.2015.01.039

**СПЕКТРЫ ФОТОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ИНАКТИВАЦИИ КОРОНАВИРУСА
SARS-COV-2 СОЛНЕЧНЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ УФБ-ДИАПАЗОНА (280–320 НМ)**
Spectra of photobiological inactivation of SARS-COV-2 coronavirus by solar UVB
radiation (280–320 nm)

В. Е. Прокопьев

Институт сильноточной электроники СО РАН, 634055, Томск, пр. Академический, 2/3
*e-mail: prokop@ogl.hcei.tsc.ru

Вспышка вирусного заболевания COVID-19 тяжелого острого респираторного синдрома – (ТОРС – англ. Severe acute respiratory syndrome coronavirus) вызванная коронавирусом (КВ-англ. COV) SARS-COV-2 поставила перед врачами и научным сообществом много сложных вопросов, связанных с объяснением причин возникновения, путей и условиях распространения эпидемии и необходимостью разработки и создания новых методов диагностики, лечения и прогноза. При этом водно-капельные частицы слюны являются основным резервуаром и средой переноса вирусов [1]. На основании многих натуральных и лабораторных исследований доказано, что в основе бактерицидного, цитотоксического и мутагенного эффектов УФ излучения лежит поглощение УФ квантов молекулами ДНК и РНК бактерий и вирусов.

По фотобиологическому действию ультрафиолетового (УФ) солнечного излучения (СИ) его условно разделяют по длинам волн на три диапазона: УФС (200 ÷ 280 нм), УФБ (280 ÷ 315(320) нм) и УФА (315(320) ÷ 400 нм).

Однако в реальных естественных условиях длины волн меньше чем 280(290) нм (УФ-С) полностью поглощаются молекулами озона, кислорода и окислами атмосферных газов уже в верхних слоях атмосферы. Поэтому до поверхности Земли полностью доходит только УФА (320÷400 нм) и частично излучение УФБ (280÷320 нм), которое значительно ослаблено и трансформировано в области длин волн 290 ÷ 300 нм.

Поэтому определение характеристик СИ в УФБ области спектра на поверхности Земли и исследование фотобиологических спектров действия, влияющих на выживаемость вирусов в этой области, представляет значительный интерес.

В настоящей работе проведены экспериментальные наземные наблюдения интенсивности и спектра СИ в УФБ диапазоне в г. Томске (56° 29' с. ш. (N), 84° 56.89' в. д. (E)) с 26.03.2020 по 18.05.2021 г.

На основе этих измерений и экспериментальных исследований спектральных характеристик биологических тканей (слюна и цельная кровь человека), а также анализа научных работ по строению и химическому молекулярному составу SARS-COV-2 определены первичные фотоакцепторы (хромофоры), молекулярные структуры и спектры фотобиологического действия инактивации КВ [2]:

гуанин – азотистое основание цепи РНК коронавируса SARS-CoV-2;
молекулы гидроксила – ОН глюкозы в положении углерода в молекуле РНК;
тирозин и триптофан – в активном центре S-белка (spike glycoprotein –) КВ.

1. Xu R., Cui B., Duan X. Zhang P., Zhou X., Yuan Q. // *Int. J. Oral. Sci.* 2020. V. 12, N. 11, P. 1–6
2. Прокопьев В.Е. Спектры фотобиологической инактивации коронавируса SARS-COV-2 солнечным излучением УФБ-диапазона (280–320 нм). // *Оптика атмосферы и океана.* 2021. Т. 8, N. 8, С. 5–12

**ЦИФРОВАЯ ГОЛОГРАФИЧЕСКАЯ МИКРОСКОПИЯ И ТОМОГРАФИЯ
КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ РЕАКЦИИ
КЛЕТОК НА ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ**
Digital holographic microscopy and tomography as efficient methodologies for
research of live cells response to photodynamic treatment

И. В. Семенова*, А. А. Жихорева, А. В. Белашов, Д. А. Горбенко,
О. С. Васютинский

ФТИ им. А.Ф. Иоффе, Санкт-Петербург, 194021, Политехническая, 36
*e-mail: irina.semenova@mail.ioffe.ru

При исследовании эффективности терапевтического воздействия на клеточном уровне важно не только выяснить, приводит ли это воздействие к гибели клеток или нет, но и идентифицировать механизмы гибели клеток при различных дозах воздействия и, таким образом, определить дозы, необходимые для запуска того или иного целевого механизма. Наиболее часто используемый метод определения механизмов гибели клеток основан на применении различных флуоресцентных красителей с наблюдением их флуоресценции в конфокальном микроскопе. Также используется анализ морфологических изменений в клетках с помощью проточной цитофлуориметрии, оптической или электронной микроскопии. В работах [1–4] мы показали преимущества методов цифровой голографической микроскопии для оценки морфологических изменений клеток при терапевтическом воздействии. Голографические методы основаны на регистрации изменений фазы просвечивающего клетки излучения, и определении пространственного распределения показателя преломления внутри клетки, которое содержит количественную информацию о клеточных параметрах. В частности, методами цифровой голографической микроскопии и томографии можно определить форму клеток, их толщину, объем, сухую массу, площадь проекции, площадь поверхности мембраны, трехмерное (3D) распределение показателя преломления. Голографические методы практически неинвазивны и дают возможность проведения наблюдений в динамике в течение длительного времени. Также важным преимуществом этих методов является работа с образцами без использования дополнительных химических реагентов.

В докладе представлен обзор проведенных нами в последние годы исследований изменений клеточной морфологии при ФДВ с использованием голографических методов. В качестве фотосенсибилизаторов использовались Радахлорин и эндогенно генерируемый протопорфирин IX. Исследования проводились на образцах клеточных культур постоянных клеточных линий разных ноологических форм, а также на образцах клеточных культур, полученных хирургическим путем у пациентов НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова. Показано, что с увеличением дозы ФДВ последовательно реализуются такие механизмы гибели клеток, как апоптоз, вторичный некроз, некроз. Причем, для клеток разных клеточных линий при сохранении этой последовательности указанные механизмы реализуются при существенно разных дозах. Результаты, полученные с помощью голографических методов, были подтверждены традиционными биологическими тестами.

1. A.V. Belashov, A.A. Zhikhoreva, T.N. Belyaeva, E.S. Kornilova, N.V. Petrov, A.V. Salova, I.V. Semenova, O.S. Vasyutinskii. *Optics Letters*, 41, 21, 5035–5038, 2016.
2. A.V. Belashov, A.A. Zhikhoreva, T.N. Belyaeva, N.N. Nikolsky, I.V. Semenova, E.S. Kornilova, O.S. Vasyutinskii. *Biomedical Optics Express*, Vol. 10, No. 10, 4975–4986, 2019.
3. D.A. Gorbenko, A.V. Belashov, T.N. Belyaeva, E.S. Kornilova, I.V. Semenova, O.S. Vasyutinskii. *JPCS*, 1236, 012015, 2019.
4. A.A. Zhikhoreva, A.V. Belashov, A.B. Danilova, N.A. Avdonkina, I.A. Baldueva, M.L. Gelfond, T.L. Nekhaeva, I.V. Semenova, O.S. Vasyutinskii. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2021, DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2021.112235

**ПРИМЕНЕНИЕ МУЛЬТИМОДАЛЬНОГО МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ
НОВООБРАЗОВАНИЙ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ОПТИЧЕСКОМ
ПРОСВЕТЛЕНИИ IN VIVO ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФДТ**
Application of a multimodal method for the study of human skin neoplasms with
optical clearing *in vivo* to increase the effectiveness of PDT

И. А. Серебрякова^{1,2*}, Ю. И. Сурков^{1,2}, Э. А. Генина^{1,2}, Е. Н. Лазарева^{1,2},
Я. К. Кузинова³, О. М. Конопацкова³, А. Н. Башкатов^{1,2}, В. В. Тучин^{1,2,4}

- 1 – Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского
 - 2 – Национальный исследовательский Томский государственный университет
 - 3 – ФГБОУ ВО Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского МЗ России
 - 4 – Институт проблем точной механики и управления РАН
- *e-mail: s.izabell2014@gmail.com, тел.+7 917 3026167

Несмотря на развитие медицины, онкологические заболевания по-прежнему остаются одними из самых опасных в настоящее время. Для диагностики и терапии новообразований все чаще предпочтение отдается неинвазивным, в том числе оптическим методам, таким как оптическая когерентная томография (ОКТ), конфокальная микроскопия, флуоресцентная спектроскопия, фотодинамическое и лазерное воздействие, эффективность которых зависит от интенсивности и глубины проникновения оптического излучения. Для изменения оптических свойств биотканей используют оптические просветляющие агенты (ОПА). Фотодинамическая терапия (ФДТ) злокачественных новообразований кожи является перспективным и функционально-щадящим методом лечения. Применение оптического просветления (ОП) кожи может способствовать повышению эффективности ФДТ кожи за счёт уточнения локализации опухоли и увеличения глубины проникновения излучения в ткань.

В работе участвовали добровольцы в возрасте от 49 до 78 лет, давшие информированное согласие на проведение исследований. В качестве объекта исследования были выбраны области с новообразованиями (базальноклеточный рак и доброкачественные новообразования) и близлежащие здоровые участки кожи для сравнения. В ходе исследования были проведены осмотр и ультразвуковое исследование, с помощью аппарата DUB SkinScanner (tpm taberna pro medicum GmbH, Германия) с двумя зондами работающими на частотах 33 и 75 МГц, глубина сканирования составляла 5 и 3.2 мм и продольное разрешение 48 и 21 мкм соответственно, получены В-сканы при помощи спектрального ОКТ GAN930V2-BU (Thorlabs, США) работающего на центральной длине волны 930 нм с аксиальным и латеральным разрешением 6 и 7.32 мкм соответственно, и глубиной сканирования 2 мм, и измерены коэффициенты диффузного отражения с помощью спектрометров USB4000-UV-VIS и NIRQUEST (Ocean Optics, США) и волоконно-оптических зондов QR400-7-VIS-NIR (Ocean Optics, США) в диапазонах 400–2150 нм исследуемых участков кожи. В качестве критерия дифференциации новообразований кожи использовались спектры комбинационного рассеяния, измеренные на тех же участках с использованием спектрометра QE65000 (Ocean Optics, США), оснащённым диодным лазером 785 нм (Ocean Optics, США) и зондом ($f = 7.5$ мм). В качестве ОПА использовался 60% водный раствор глицерина, который наносился на исследуемый участок на 10 минут. Результат ОП регистрировался с помощью ОКТ до и после аппликации ОПА. Полученные томограммы использовались для определения увеличения глубины проникновения света в кожу под действием ОПА. Описанный мультимодальный подход позволяет оценить общее состояние кожи, обозначить границы новообразования и оценить его размеры, а также определить его внутреннюю структуру. Представленные результаты могут оказаться полезными для оптической диагностики заболеваний кожи и уточнения параметров ФДТ и лазерной терапии при ОП.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-52-56005.

КЛЕТОЧНЫЕ И ФОТОДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГУАНИДИНОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ХЛОРИНА e6, ИНКАПСУЛИРОВАННОГО В НАНОЧАСТИЦЫ

Мария Александровна Соколова^{1,2}, Анастасия Александровна Игнатова^{2*},
Петр Васильевич Островерхов¹, Анастасия Владимировна Ефременко^{2,3},
Михаил Александрович Грин¹, Андрей Федорович Мионов¹,
Алексей Валерьевич Феофанов^{2,3}

1 – Институт тонких химических технологий имени М. В. Ломоносова, «МИРЭА – Российский технологический университет» РТУ МИРЭА, Москва, Россия

2 – ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

3 – Биологический факультет Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: aignatova_83@mail.ru

Фотодинамическая терапия злокачественных опухолей (ФДТ) – это неинвазивный и эффективный современный метод терапии рака, заключающийся в введении специальных агентов – фотосенсибилизаторов (ФС), селективно накапливающихся в опухоли, с последующим локальным облучением светом определенной длины волны. В результате образуются активные формы кислорода (АФК), вызывающие гибель злокачественных клеток. Современное развитие ФДТ требует создания новых ФС, а также систем их направленной доставки для повышения селективности и эффективности терапии, и минимизации побочных эффектов [1]. Перспективным способом доставки считается инкапсулирование препаратов в наночастицы, что, как правило, увеличивает время циркуляции препарата в кровотоке. Кроме того, имеются возможности поверхностной модификации наночастиц для таргетной доставки в опухолевую ткань [2]. Железосодержащие наночастицы могут быть использованы не только для доставки ФС, но и для визуализации опухоли, например, методом МРТ [3].

В данной работе исследованы фотодинамические и клеточные свойства гуанидинового производного хлорина e6 (e6-GUA), инкапсулированного в ферромагнитные наночастицы, покрытые полиэтиленгликолем. Показано, что наночастицы с заключенным в них e6-GUA стабильны в течение 6 месяцев при хранении на +4°C. В водной среде e6-GUA находится внутри наночастиц в агрегированном состоянии, при этом не наблюдается генерация АФК, отсутствует флуоресценция. Однако в мембрано-подобном окружении (эмульсия кремофора EL) наблюдали интенсивную генерацию синглетного кислорода при облучении светом, квантовый выход $0,8 \pm 0,05$, что совпадает со значением для соединения e6-GUA без наночастиц. Показано, что e6-GUA, инкапсулированный в наночастицы, эффективно накапливается в цитоплазме клеток аденокарциномы легкого человека A549 и вызывает фотоиндуцированную гибель клеток в наномолярном диапазоне концентраций.

Таким образом, e6-GUA, инкапсулированный в наночастицы обладает эффективным фотодинамическим действием в отношении раковых клеток.

Работа была поддержана фондом РФФИ (грант № 19-04-00854)

1. Abrahamse H. et al. *Biochemical Journal*. 2016; 473(4): 347–364
2. Colombeau L. et al. *Topics in Current Chemistry* 2016; 370: 113–134
3. Zhao X. et. al. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2014; 14:210–20

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ДОНОРОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЕМ УФ-СВЕТА (254 НМ) Investigation of the spectral characteristics of donor red blood cells (RBC's) modified by UV light (254 nm)

Л. О. Соколова*, П. Е. Палкина, О. В. Путинцева, В. Г. Артюхов

Воронежский государственный университет, Медико-биологический факультет, кафедра биофизики и биотехнологии, Университетская площадь, 1, корпус 1, г. Воронеж, 394018, Россия

*e-mail: lyudmila.sokolova.94@mail.ru, Тел.: +7(473)220-85-86

При лечении ряда заболеваний современная медицина применяет УФ-свет с длиной волны 254 нм, так как он обладает мощным бактерицидным действием и используется в практике АУФОК-терапии. Остается открытым вопрос об изучении фотопроцессов, протекающих в эритроцитах при применении фототерапии, что имеет фундаментальное значение для решения ряда практических задач.

Целью работы явилось исследование влияния УФ-света (254 нм) на спектральные свойства эритроцитарных клеток. Эритроциты из крови доноров получали по стандартной методике [1]. УФ-облучение суспензий клеток с $\lambda_{\max} = 254$ нм проводили с помощью облучателя Bio-Link-BLX (Vilber Lourmat, Франция) в дозах 300, 750 и 2270 Дж/м². Электронные спектры поглощения (ЭСП) нативных и фотомодифицированных эритроцитов регистрировали на спектрофотометре UV-2401 PC («Shimadzu», Япония) в диапазоне длин волн от 200 до 700 нм.

ЭСП интактных эритроцитов характеризовались наличием полос поглощения при 274–276, 345–347, 418, 543–544 и 578 нм, что практически соответствует максимумам поглощения оксиформы гемоглобина (HbO₂) [2]. Установлено, что после облучения УФ-светом в дозах 300 и 750 Дж/м² статистически достоверных изменений величины оптической плотности во всех максимумах ЭСП исследуемых эритроцитов обнаружено не было, то есть эритроцитарные клетки демонстрировали высокую устойчивость к действию малых доз УФ-излучения. ЭСП эритроцитов после воздействия УФ-света в дозе 2270 Дж/м² отличались сглаживанием пика при 345–347 нм и переходом его в «плечо» полосы Core, максимум которой сместился до 409–411 нм, а интенсивность светоположения снизилась до $0,883 \pm 0,03$. Оптическая плотность в β- и α-максимумах статистически достоверно снижалась по сравнению с контролем до $0,644 \pm 0,01$ и $0,634 \pm 0,01$. Отмечалось наличие нового максимума при 627–631 нм, который характерен для окисленной формы гемоглобина – метгемоглобина.

Таким образом, исследование эритроцитарных клеток с помощью метода спектрофотометрии показало, что УФ-излучение с длиной волны 254 нм в большой дозе (2270 Дж/м²) приводит к существенному изменению ЭСП эритроцитов, свидетельствующему о нарушениях структуры гемопротейда и накоплении метгемоглобина и других фотопродуктов в суспензиях УФ-модифицированных эритроцитов. Выявленные изменения спектральных характеристик указывают на фотопревращения при этом гемовой и глобиновой частей HbO₂ суспензий эритроцитов. Характер и степень УФ-индуцированных изменений названных клеток зависят от дозы облучения.

1. Артюхов В.Г. и др. Практикум по биофизике. Изд-во ВГУ, 2016, 314 с
2. Артюхов В.Г., Калаева Е.А., Путинцева О.В., Башмакова Т.Н. Спектральные характеристики внутриэритроцитарного гемоглобина человека, модифицированного NO-содержащими лекарственными препаратами Сборник научных трудов VI съезда биофизиков России : в 2 томах, 2019, т.2, с. 165

**АСИММЕТРИЧНОЕ ТУШЕНИЕ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА В БИСЛОЙНЫХ
ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ МОЛЕКУЛАМИ СТИРИЛОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ**
*Asymmetric quenching of singlet oxygen in bilayer lipid membranes by molecules of
styryl dyes*

В. С. Соколов^{1*}, А. Н. Константинова¹, Т. Р. Галимзянов¹, Ю. Г. Горбунова^{1,2}

1 – Институт физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН, Москва, 119991 Россия

2 – Институт общей и неорганической химии им. Н. С. Курнакова РАН, Москва, 119991 Россия
*e-mail: sokolovvs@mail.ru, тел: +79161963800

Фотосенсибилизаторы (ФС), применяемые в фотодинамической терапии, убивают раковые клетки из-за окисления синглетным кислородом (СК), образующимся при их возбуждении, жизненно важные молекулы-мишени, которыми в мембране являются липиды или белки. На эффективность ФС влияет взаимное расположение молекул ФС и мишени в мембране, поскольку из-за ее малой толщины корреляционное время нахождения в ней СК составляет около 10 нс, что намного меньше времени жизни СК в предельном углеводороде – среде, близкой к гидрофобной области липидной мембраны. Фотодинамические процессы изучали на бислойной липидной мембране (БЛМ), моделирующей основные свойства клеточной мембраны. Взаимное положение мишени и ФС изменялось при использовании различных ФС, молекулы которых располагаются в липидном бислое на разной глубине, а также мишеней, которые адсорбировались либо с той же (цис) стороны БЛМ, что и молекулы ФС, либо с противоположной (транс) стороны. Адсорбцию молекул ФС и мишеней на БЛМ, а также скорость разрушения мишеней регистрировали, измеряя разность граничных потенциалов БЛМ ($\Delta\phi_b$) [1]. Скорость R разрушения мишеней – молекул стироловых красителей di-4-ANEPPS – для ряда ФС оказалась меньше с цис стороны БЛМ, чем с транс стороны. Величина R уменьшалась при увеличении плотности молекул красителей на БЛМ, причем их эффект с цис стороны был сильнее, чем с транс стороны. Это объяснялось тушением СК молекулами красителей, более эффективным с цис стороны по сравнению с транс стороной. Эффект «асимметричного тушения» наблюдался только с красителями ANEPPS группы, но отсутствовал с красителями RH группы, структура которых отличалась ароматическими кольцами на конце молекулы: нафталиновым у ANEPPS и бензольным – у RH. Для объяснения этого эффекта предложена модель [2], согласно которой в реакции с СК участвуют два участка молекулы красителя: ароматическое кольцо на конце молекулы и ненасыщенная углеводородная цепь в середине ее. Основной вклад в разрушение молекулы красителя вносит ароматическое кольцо, и именно этот процесс приводит к изменению $\Delta\phi_b$ при освещении мембраны с адсорбированными на ней молекулами ФС и мишени. Реакция углеводородной цепи с СК приводит к тушению последнего, что не приводит к заметному изменению $\Delta\phi_b$, но защищает от воздействия СК ароматическое кольцо. Эффект асимметричного тушения наблюдался только с ФС, молекулы которых погружаются в углеводородную область мембраны, и отсутствовал с ФС, молекулы которых располагались на поверхности мембраны. Это объясняется более близким расстоянием к мишени от точки образования СК молекулой ФС, погруженной в мембрану.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00694.

1. V.S. Sokolov, A.N. Gavrillchik, A.O. Kulagina, I.N. Meshkov, P. Pohl, and Y.G. Gorbunova, *J. Photochem. Photobiol. B* 161 (2016) 162–169
2. V.S. Sokolov, O.V. Batischev, S.A. Akimov, T.R. Galimzyanov, A.N. Konstantinova, E. Malingriaux, Y.G. Gorbunova, D.G. Knyazev, and P. Pohl, *Sci. Rep.* 8 (2018) 14000

**ИНТЕНСИФИКАЦИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПУРПУРНОЙ
НЕСЕРНОЙ БАКТЕРИИ *CEREIBACTER SPHAEROIDES* ВКМ
B-3534D – ПРОДУЦЕНТА БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА *a***
*High-density cultivation of the purple non-sulfur bacterium *Cereibacter sphaeroides*
VKM B-3534D producing bacteriochlorophyll *a**

**Полина Старыгина^{1,2*}, Анна Хуснутдинова¹, Ольга Чудакова^{1,3},
Анатолий Цыганков¹**

1 – ИФПБ РАН, обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Институтская, 2, г. Пушкино, Московская область, 142290, Россия

2 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пушкинский государственный естественно-научный институт», пр-т Науки, 3, Пушкино, Московская область, 142290, Россия

3 – МИРЭА – Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий имени М. В. Ломоносова), Москва, 119454, Россия

*e-mail: staryginapolina@yandex.ru, тел. 8(4967)732791

Фотодинамическая терапия – это неинвазивный способ лечения, основанный на взаимодействии нетоксичных самих по себе соединений и света определенной длины волны. Бактериохлорофилл *a* (Бхл *a*) – основной пигмент фотосинтезирующих бактерий – является перспективным соединением для применения в фотодинамической терапии. Для начала клинических испытаний фотосенсибилизаторов, уже созданных на основе Бхл *a* и прошедших стадию доклинических исследований, необходима разработка интенсивной лабораторной технологии получения этого пигмента.

Максимальное содержание Бхл *a* в клетках пурпурных бактерий наблюдается в фототрофных анаэробных условиях при лимитировании роста светом, однако это приводит к низкому содержанию биомассы вследствие самозатенения культур. Поэтому интерес представляет хемогетеротрофное аэробное культивирование пурпурных бактерий, но кислород подавляет синтез Бхл *a*. В то же время при выращивании в хемогетеротрофных условиях со снижением парциального давления кислорода, содержание Бхл *a* в биомассе растет. Таким образом, требуется лимитирование культур кислородом.

Целью данной работы был подбор режима культивирования *Cereibacter sphaeroides* ВКМ B-3534D в хемогетеротрофных условиях и оптимизация среды-титранта для интенсивного культивирования. В качестве режима культивирования был выбран продленный периодический режим с подпиткой концентрированным раствором всех питательных компонентов. Для автоматической подачи питательной среды по мере потребления питательных веществ в качестве органического субстрата были выбраны уксусная и молочная кислоты. Их потребление приводит к повышению pH культуры, причем изменение pH зависит от скорости роста культур и скорости удаления углекислого газа. Сам процесс культивирования проводился в три стадии. На первой стадии культура адаптировалась к условиям в реакторе. На второй стадии проводилось наращивание биомассы бактерий при оптимальных для роста концентрациях растворенного кислорода. На третьей стадии культура переводилась в режим лимитирования кислородом и происходило преимущественное накопление Бхл *a*. Был произведен первоначальный расчет среды-титранта с последующей экспериментальной корректировкой.

В результате работы был оптимизирован состав среды-титранта, что привело к увеличению конечной концентрации сухой биомассы клеток до 50–55 г/л культуры, повышению содержания Бхл *a* до 400–450 мг/л культуры и сокращению времени культивирования до 45–70 часов.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-14-00255.

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОПТИЧЕСКОГО ПРОСВЕТЛЕНИЯ
КОЖИ ЧЕЛОВЕКА С РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНЬЮ ПИГМЕНТАЦИИ**
**Comparative study of optical clearing of human skin with different degrees of
pigmentation**

**Ю. И. Сурков^{1,2*}, И. А. Серебрякова^{1,2}, Э. А. Генина^{1,2}, А. Н. Башкатов^{1,2},
В. В. Тучин^{1,2,3}**

1 – Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

2 – Национальный исследовательский Томский государственный университет

3 – Институт проблем точной механики и управления РАН

*e-mail: surkov9898@gmail.com, тел.+7 964 848 14 45

Достичь увеличения эффективности фотодинамической терапии (ФДТ) кожи можно с помощью оптического просветления (ОП), эффективность которой зависит от интенсивности и глубины проникновения оптического излучения. Серьезной проблемой современной биофизики продолжает оставаться транспорт зондирующего излучения через поверхностные слои биоткани. Пигментация кожи также является причиной ослабления светового луча. [1, 2]

Для разработки метода оценки содержания хромофоров (гемоглобин, меланин и др.) и определения глубины проникновения оптического излучения в кожу использовались трехслойные оптические фантомы, содержащие желатин, интралипид (Fresenius Kabi, Австрия), гемоглобин (ООО «АГАТ-МЕД», РФ) и различные концентрации меланина (Sigma-Aldich M-2649, Германия), имитирующий различные фототипы меланиновой пигментации по шкале Фитцпатрика. Оптические параметры фантомов измерялись с помощью спектрофотометра с интегрирующей сферой UV-3600 (Shimadzu, Япония) и многоканальных спектрометров USB4000-UV-VIS и NIRQUEST (Ocean Optics, США) и волоконно-оптических зондов QR400-7-VIS-NIR (Ocean Optics, США) в диапазонах 400–2150 нм. Коэффициенты поглощения, рассеяния, транспортный коэффициент рассеяния, а также коэффициент анизотропии рассеяния образцов рассчитывались с помощью инверсного метода добавления-удвоения.

Исследования оптического просветления кожи человека *in vivo* проводились на коже тыльной стороны кисти руки шести добровольцев в возрасте 20–26 лет, трое из которых имели II фототип (слабая пигментация) и трое – VI фототип (сильная пигментация) кожи согласно шкале Фитцпатрика. В качестве оптического просветляющего агента использовалась олеиновая кислота в комбинации с микродермабразией и ультразвуковым воздействием. Мониторинг состояния кожи проводился с помощью оптического когерентного томографа SpectralRadar OCT System OCP930SR 022 (Thorlabs Inc., США) с центральной длиной волны источника излучения 930±5 нм.

В результате исследования проведена оценка содержания меланина в коже и определена глубина проникновения оптического излучения видимого и ближнего инфракрасного диапазонов в кожу с различной степенью пигментации, а также получены значения скорости и эффективности оптического просветления слабо и сильно пигментированной кожи человека *in vivo*. Глубина проникновения оптического излучения увеличилась более чем в 1,4 и 1,2 раза для II и VI фототипа кожи, соответственно.

Результаты исследования могут быть полезными для уточнения параметров ФДТ и увеличение эффективности оптической диагностики и лазерной терапии при ОП.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-52-56005.

1. Tuchin V. V. et al. Tissue optics. // *Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE)*, 2015. 812 P

2. Costantini I., et al. *In-vivo* and *ex vivo* optical clearing methods for biological tissues: review // *Biomed. Opt. Express*. 2019. vol. 10. no. 10. P. 5251–5267.

**ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ В ЛЕЧЕНИЕ ДЕМОДЕКОЗА КОЖИ
ЛИЦА С МЕСТНЫМ ПРИМЕНЕНИЕМ ГЕЛЯ НА ОСНОВЕ 5-АЛК**

Н. И. Григорьевых, Е. В. Филоненко, С. С. Окушко, А. Д. Каприн

МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ НМИЦР МЗ РФ

Фотодинамическая терапия (ФДТ) с препаратами на основе 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК) является признанным подходом к лечению розацеи кожи лица.

Цель настоящего исследования – изучить эффективность ФДТ с применением геля на основе 5-АЛК у пациентов с розацеей (демодекозом) кожи лица.

Материалы и методы: исследование включило 15 пациентов с демодекозом кожи лица. У 15 из них предшествующего лечения не было. Для проведения ФДТ применяли препарат 5-АЛК – гель левулон (Россия). Сеанс ФДТ проводили с использованием лазера длиной волны 630 нм.

Результаты: Лечение хорошо переносилось у всех пациентов как мужчин, так и женщин. Полный ответ зарегистрирован у 15 больных с отличным косметическим результатом после одного курса ФДТ.

Выводы: Таким образом, результаты исследования показали эффективность применения препарата 5-АЛК (левулон) у пациентов с розацеей (демодекозом) кожи лица.

ИНГИБИРОВАНИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗОВАННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ЛИПОСОМ В ПРИСУТСТВИИ ДЕЙТЕРИРОВАННЫХ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ
Inhibition of photodynamic damage to liposomes by deuterated PUFA

**А. М. Фирсов^{1*}, Е. А. Котова¹, М. А. Фомич², А. В. Бекиш², О. Л. Шарко²,
 В. В. Шманай², Ю. Н. Антоненко¹, М. С. Щепинов³**

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

2 – Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

3 – Retrotope, Inc., Los Altos, CA, USA

*e-mail: firsov@belozersky.msu.ru, тел. +7 915 3472394

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) лежит в основе патогенеза многих нейро-дегенеративных заболеваний и других патологий. Включение остатков дейтерированных полиненасыщенных жирных кислот (Д-ПНЖК) в липиды мембран является перспективным подходом для защиты от ПОЛ. Ранее нами было продемонстрировано выраженное подавление ПОЛ, инициированного комбинацией железа и аскорбата, при наличии в мембране около 20% Д-ПНЖК, с атомами дейтерия вместо атомов водорода в бис-аллильных положениях [1]. В настоящей работе показано защитное действие Д-ПНЖК при фотодинамической индукции (освещении в присутствии фотосенсибилизатора) ПОЛ в липосомах с помощью трех различных методов: 1) по флуоресценции липосом, нагруженных флуоресцирующим красителем сульфородаминоном Б, методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС); 2) по образованию диеновых конъюгатов, измеренному по оптической плотности при 234 нм и 3) по фотоинаktivации каналов грамицидина А на плоской бислоидной липидной мембране (БЛМ). В качестве фотосенсибилизатора мы использовали трижды сульфированный фталоцианин алюминия (AlPcS3). Если липосомы не содержали Д-ПНЖК, освещение в течение одной минуты приводило к значительному увеличению поглощения при 234 нм и снижению автокорреляционной функции (АКФ) при измерении методом ФКС, что свидетельствовало о повреждении липосом в результате ПОЛ, вызванного фотодинамическим воздействием. Если же липосомы на 50% состояли из липидов, содержащих остатки Д-ПНЖК, то при освещении в присутствии AlPcS3 как накопление диеновых конъюгатов, так и снижение АКФ (т.е. нарушение целостности мембран липосом) становились незначительными. На плоской БЛМ было обнаружено снижение скорости фотоинаktivации грамицидина А при наличии в мембране уже 20% Д-ПНЖК.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант №21-14-00062)

1. Firsov A.M., Fomich M.A., Bekish A.V., Sharko O.L., Kotova E.A., Saal H.J., Vidovic D., Shmanai V.V., Pratt D.A., Antonenko Y.N., Shchepinov M.S. Threshold protective effect of deuterated polyunsaturated fatty acids on peroxidation of lipid bilayers. *FEBS J.* 286 (2019) 2099–2117

ПУРПУРНАЯ НЕСЕРНАЯ БАКТЕРИЯ *CEREIBACTER SPHAEROIDES* ВКМ В-3534D – ПРОДУЦЕНТ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА *a*
New strain of the purple non-sulfur bacteria *Cereibacter sphaeroides* VKM B-3534D for production bacteriochlorophyll *a*

**Ольга Чудакова^{1,2*}, Анна Хуснутдинова¹, Татьяна Лауринавичене¹,
 Полина Старыгина^{1,3}, Анатолий Цыганков¹**

1 – ИФПБ РАН, обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Институтская, 2, г. Пушкино, Московская область, 142290, Россия

2 – МИРЭА – Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова), Москва, 119454, Россия

3 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пушкинский государственный естественно-научный институт», пр-т Науки, 3, Пушкино, Московская область, 142290, Россия

*e-mail: Chuda94@yandex.ru, тел. 8(4967)732791

Бактериохлорофилл *a* (Бхл *a*) является перспективным соединением для использования в фотодинамической терапии из-за поглощения в инфракрасном диапазоне и других важных фотофизических свойств. Этот пигмент встречается у анаэробных фотосинтезирующих бактерий и входит в состав фотосинтетического аппарата.

Пурпурные несерные бактерии обладают необычайной подвижностью метаболизма и могут расти в фотогетеротрофных анаэробных условиях, хемоавтотрофных и хемогетеротрофных аэробных условиях в широком диапазоне концентраций растворенного кислорода, а также в хемогетеротрофных анаэробных условиях за счет брожения. При этом многие представители этой группы бактерий способны расти с одинаковой скоростью роста как на свету, так и в темновых аэробных условиях. Именно поэтому пурпурные несерные бактерии являются наиболее предпочтительными продуцентами Бхл *a*.

Целью проведенной работы был выбор продуцента Бхл *a*, подходящего в дальнейшем для промышленного использования. Такой штамм должен отвечать следующим требованиям: высокая скорость роста и способность расти в присутствии повышенных концентраций компонентов питательной среды.

Был выбран штамм пурпурной несерной бактерии *Cereibacter sphaeroides* ВКМ В-3534D. Этот штамм был выделен из проб прибрежных вод Желтого моря. Сравнение полученного штамма проводили с типовым штаммом *Rhodobacter capsulatus* штамм В10. Исследования показали, что *Cereibacter sphaeroides* ВКМ В-3534D имеет время удвоения ~2,8 часа в хемогетеротрофных условиях с использованием лактата и ацетата в качестве источников углерода, тогда как *Rhodobacter capsulatus* штамм В10 имел время удвоения более 3 часов. Также, эта бактерия обладает способностью расти при повышенных концентрациях фосфатов, аммония и органических кислот. Так, при увеличении концентрации лактата и ацетата в среде *Cereibacter sphaeroides* ВКМ В-3534D была способна выдерживать 60 Мм лактата и 60 мМ ацетата, тогда как *Rhodobacter capsulatus* штамм В10 не рос уже при концентрации 50 Мм лактата и 50 мМ ацетата. Также, *Cereibacter sphaeroides* ВКМ В-3534D была способна расти при концентрации аммония 260 мМ, тогда как *Rhodobacter capsulatus* штамм В10 не росла уже при 60 мМ аммония. *Rhodobacter capsulatus* штамм В10 выдерживала не более 18 г/л фосфатов, тогда как *Cereibacter sphaeroides* ВКМ В-3534D росла и при 27 г/л фосфатов. Таким образом, *Cereibacter sphaeroides* ВКМ В-3534D может использоваться в качестве продуцента Бхл *a* в интенсивных технологиях, где возможны колебания концентраций различных компонентов в широком диапазоне.

ИССЛЕДОВАНИЕ СЕРИИ ПОРФИРАЗИНОВЫХ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ СО СВОЙСТВАМИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ И СЕНСОРОВ ЛОКАЛЬНОЙ ВЯЗКОСТИ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ
Study of a series of porphyrazine metal complexes with the properties of photosensitizers and local viscosity sensors for solving problems of personalized photodynamic therapy

**Наталья Шилягина^{1*}, Лидия Шестакова¹, Андрей Юдинцев¹,
Светлана Лермонтова², Лариса Клапшина²**

¹ – Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского
² – Институт металлоорганической химии им. Г. А. Разуваева Российской академии наук
 *e-mail: nat-lekanova@yandex.ru, тел. +79625160605

Несмотря на высокую эффективность, избирательность и хорошую переносимость фотодинамической терапии (ФДТ) задача создания «идеального» фотосенсибилизатора (ФС) остается нерешенной, именно поэтому поиск новых препаратов является ключевым звеном на пути совершенствования технологии противоопухолевой терапии. Помимо необходимости поиска «идеального» ФС, метод ФДТ ограничен отсутствием возможности адекватной и своевременной корректировки световой дозы, подводимой к опухоли, в зависимости от ответа облучаемой ткани.

Целью нашего исследования было изучение порфиразиновых металлокомплексов в качестве потенциальных агентов для персонализированной ФДТ с возможностью контроля её эффективности в режиме реального времени.

В качестве металлокомплексов мы исследовали тетра(тиофен-3-ил)тетрацианопорфиразинаты железа, меди и тетра(бензотиофен-2-ил)тетрацианопорфиразинаты железа, меди и палладия.

Нами было показано наличие у исследуемых порфиразиновых металлокомплексов интенсивных пиков поглощения и флуоресценции в диапазонах биологического окна прозрачности. Было зарегистрировано существенное возрастание квантового выхода и времени жизни флуоресценции всех исследуемых порфиразиновых металлокомплексов при увеличении вязкости среды в эксперименте на спирто-глицериновых смесях. Полученные данные свидетельствуют о принадлежности исследуемых металлокомплексов к классу флуоресцентных молекулярных роторов, характеризующихся высокой вязкостной чувствительностью параметров флуоресценции.

Показано, что исследуемые порфиразиновые металлокомплексы характеризуются интенсивным накоплением в опухолевых клетках эпидермоидной карциномы человека A431. Зарегистрированы высокие фотодинамические индексы в эксперименте на клеточных культурах для порфиразинатов железа, меди и палладия с бензотиофеновой группировкой.

Показано увеличение времени жизни возбужденного состояния порфиразиновых металлокомплексов в клетках A431 при фотодинамическом воздействии, в необлученных клетках подобных изменений зарегистрировано не было. При этом показано, что при увеличении дозы фотодинамического воздействия происходит увеличение времени жизни возбужденного состояния порфиразиновых металлокомплексов в клетках. Полученные данные, по всей видимости, свидетельствуют об увеличении локальной внутриклеточной вязкости в клетках, подвергнутых фотодинамическому воздействию.

Таким образом, проведенные исследования демонстрируют перспективность использования порфиразиновых металлокомплексов для решения задач персонализированной ФДТ, в которой состояние опухолевых клеток может контролироваться по изменению внутриклеточной вязкости, которая может быть оценена через измерение времени жизни флуоресценции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Стипендии Президента РФ №СП-1609.2021.4

АНАЛИЗ ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОХЛОРИН-НАФТАЛИМИДНЫХ КОНЬЮГАТОВ НА КЛЕТКАХ САРКОМЫ S37
Analysis of photobiological properties of bacteriochlorin-naphthalimide conjugates on S37 sarcoma cells

**Г. С. Юсуп¹, Д. А. Притъмов^{1*}, М. А. Грин¹, А. Ф. Миронов¹, М. А. Павлова²,
П. А. Панченко², О. А. Фёдорова², Н. Б. Морозова³, А. Д. Плютинская³,
А. А. Панкратов³**

¹ – РТУ-МИРЭА, 119454, Россия, Москва, пр. Вернадского, 86
² – ИНЭОС РАН, 119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, 28
³ – МНИОИ им. П. А. Герцена, 125284, Россия, Москва, 2-й Боткинский пр., 3
 *e-mail: dimanick96@mail.ru, тел. +7 925 8229865

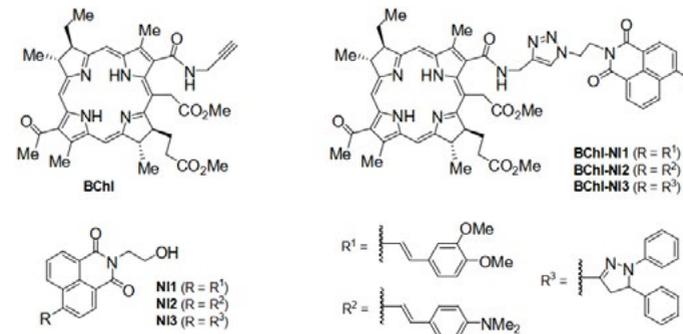
Фотомедицина – одно из перспективных направлений лечения онкологических заболеваний. Благодаря таким преимуществам, как неинвазивность, избирательность действия и низкая токсичность, применение фотодинамической терапии позволяет значительно улучшить качество жизни пациентов. Однако, данный метод предъявляет ряд требований к терапевтическим агентам, что приводит к необходимости модифицировать уже зарекомендовавшие себя препараты и создавать новые, например, комбинированием фотосенсибилизаторов с другими агентами.

Тераностические агенты на основе бактериохлорина и нафталимидов представляют огромный интерес за счёт своих уникальных индивидуальных свойств. Такие агенты призваны значительно сократить интервал между диагностикой опухоли и её безоперационным удалением.

Производное бактериохлорина с терминальной тройной связью было конъюгировано с азидами трёх нафталимидов, различающихся заместителями в 4-ом положении. Свойства полученных тераностических агентов были исследованы на клетках мышины саркомы S37 *in vitro* и *in vivo* с целью сравнения их фотоиндуцированной цитотоксичности и противоопухолевой активности с индивидуальным бактериохлорином. Результаты показали, что при облучении лазером нафталимидного фрагмента в конъюгате происходит резонансный перенос энергии от флюорофора к фотосенсибилизатору, что приводит к увеличению флуоресценции фотосенсибилизатора при сохранении эффективной генерации синглетного кислорода [1].

Работа была поддержана Российским Научным Фондом (грант № 21-13-00078)

1. N.B. Morozova, M.A. Pavlova, A.D. Plyutinskaya, A.A. Pankratov, K.T. Efendiev, A.S. Semkina, D.A. Pritmov, A.F. Mironov, P.A. Panchenko, O.A. Fedorova. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2021 (in press)



СЕКЦИЯ 5. БИОФТОНИКА МОЛЕКУЛ И НАНОЧАСТИЦ

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТКАНИ ЛЕГКИХ КРЫС ПРИ ИНГАЛЯЦИИ АЭРОЗОЛЯ ЖИДКОСТИ ДЛЯ ЭЛЕКТРОННЫХ СИГАРЕТ НА ОСНОВЕ ПОЛИПРОПИЛЕНГЛИКОЛЯ И ГЛИЦЕРИНА

Алла Бучарская^{1,2,3}, Дмитрий Мудрак¹, Ирина Янина^{2,3}, Никита Наволокин^{1,2}, Алексей Башкатов^{2,3}, Элина Генина^{2,3}, Юрий Кистенев³, Валерий Тучин^{2,3*}

1 – Саратовский государственный медицинский университет им. В.И.Разумовского Минздрава России

2 – Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

3 – Томский национальный исследовательский государственный университет

*e-mail: tuchinv@mail.ru, тел. +7 8452210722

Для потенциального использования в качестве диагностического теста изучали морфологические изменения ткани легких лабораторных крыс при действии на нее жидкости для электронных сигарет на основе полипропиленгликоля и глицерина *ex vivo* и *in vivo*. В исследованиях *ex vivo* использовали легкие крыс линии Вистар, помещенные на 1 час в жидкость для электронных сигарет. Исследование *in vivo* проводили на 12 половозрелых самцах крыс линии Вистар массой 200±20 г. Животные были разделены на две группы – опытную и контрольную, по 6 крыс в каждой. Крыс опытной группы помещали в затравочную камеру и нагнетали в нее через специальную установку аэрозоль безникотиновой жидкости для электронных сигарет – по 1,5 литра в течение 10 минут, затем 2 минуты перерыв, таким образом – пять раз по 10 минут – всего крысы получили по 7,5 литров аэрозоля. Крысы контрольной группы были интактными. Животных выводили из эксперимента через час после ингаляции, забирали легкие. Образцы легочной ткани *ex vivo* исследовали при помощи оптической когерентной томографии (ОКТ) и спектроскопии тканей легких. После проведения манипуляций и измерений образцы легких фиксировали в 10% растворе формалина и заключали в парафин. Затем изготавливали гистологические срезы по общепринятым методикам с последующей их окраской гематоксилином и эозином.

Исходя из сравнительного анализа В-сканов *ex vivo* исследований легочной ткани, помещенной в жидкость для электронных сигарет и контрольных образцов, можно сделать вывод о просветлении ткани легких изучаемым раствором, т.к. альвеолы заполняются раствором и рассеяние снижается. Структура ткани отличается от контрольных образцов. Для В-сканов *in vivo* исследований характерно наличие пустот (образований) достаточно больших размеров. При гистологическом исследовании образцов *ex vivo* и *in vivo* отмечали морфологические изменения структуры легочной ткани, соответствующие изменениям, наблюдаемым при ОКТ.

Исследования выполнены при поддержке гранта по Постановлению Правительства Российской Федерации № 220 от 09 апреля 2010 г. (Соглашение № 075-15-2021-615 от 04.06.2021 г.).

ФОТОБИОМОДУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В ТРЕХМЕРНЫХ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКТАХ Photobiomodulation of mesenchymal stromal cells metabolism in 3D tissue-engineered constructs

Полина Бикмулина^{1*}, Настасья Кошелева^{1,2}, Анастасия Шпичка^{1,3}, Владимир Юсупов⁴, Юрий Рочев^{1,5}, П. С. Тимашев^{1,3,4,6}

1 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

2 – НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

3 – МГУ им. М. В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

4 – Институт фотонных технологий ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия

5 – National University of Ireland, Galway (NUI Galway), Galway, Ireland

6 – Институт химической физики имени Н. Н. Семенова, Отдел полимеров и композиционных материалов, Москва, Россия

*e-mail: bikmulina_p_yu@staff.sechenov.ru, тел. +7 985 1854983

В настоящее время использование клеточных конструктов с использованием технологий биопечати является одним из наиболее перспективных направлений регенеративной медицины. Однако, их применение в клинической практике до сих пор затруднено, прежде всего вследствие обширной клеточной гибели в масштабированных конструктах. Одним из многообещающих подходов к стимулированию выживания, пролиферации и метаболизма клеток в трехмерных системах является фотобиомодуляция (ФБМ) [1]. В данной работе были исследованы основные эффекты красного и ближнего инфракрасного света для первичной культуры мезенхимных стромальных клеток (МСК) в трехмерных культурах.

Для ФБМ клеточных культур использовали монохроматические светодиодные излучатели (ИФТ РАН, Россия), облучение проводили в красном (633 нм, 1200 с, 22 кДж/м²) и ближнем инфракрасном (840 нм, 600 с, 21 кДж/м²) диапазонах. В качестве трёхмерной системы культивирования клеток были выбраны гидрогелевые скаффолды из модифицированного фибрина, а биопечать выполняли на биопринтере CellInk Bio X (CellInk, США). Для оценки жизнеспособности и метаболической активности клеток после ФБМ использовали ряд классических методов – AlamarBlue, МТТ и Live/Dead (ThermoFisher, США). Скорость пролиферации анализировали с помощью теста PicoGreen (ThermoFisher, США). Скорость потребления кислорода митохондриями измеряли с помощью теста Seahorse Assay (Agilent, США).

Было показано, что ФБМ активирует дыхательную цепь митохондрий – наиболее высокие показатели скорости потребления кислорода (OCR) обнаруживали через 2 часа после стимуляции ФБМ 633 нм и через 2 и 6 часов после стимуляции в ФБМ 840 нм. Оба режима ФБМ увеличивали OCR клеток, ингибированных ротеноном, на 15–20%. Было подтверждено, что жизнеспособность клеток в трехмерных условиях зависит от толщины и концентрации гидрогеля, и их пролиферация снижается в среднем на 20%. ФБМ была способна вернуть активность клеток в трехмерной культуре к контрольным значениям. Наиболее выраженные эффекты стимуляции наблюдали для ближнего инфракрасного света. ФБМ в ближнем инфракрасном диапазоне также повышала митохондриальную активность клеток, инкапсулированных в гидрогель, на 10–15%.

Работа была выполнена при поддержке РФФИ (грант № 20-04-60063) и Мегагранта Правительства РФ (грант № 075-15-2021-596).

1. Karu T.I. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation, 2008.

ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТКАНЕЙ ХОЛАНГИОКАРЦИНОМЫ В СПЕКТРАЛЬНОМ ДИАПАЗОНЕ 350–2000 НМ ПРИ ПЛАЗМОННОЙ ФОТОТЕРМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ
Optical properties of cholangiocarcinoma tissues in the spectral range of 350–2000 nm under plasmon photothermal therapy

Вадим Д. Генин^{1,2*}, Элина А. Генина^{1,2}, Алла Б. Бучарская³, Георгий С. Терентюк³, Николай Г. Хлебцов^{1,4}, Валерий В. Тучин^{1,2,5}, Алексей Н. Башкатов^{1,2}

- 1 – Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского
 2 – Национальный исследовательский Томский государственный университет
 3 – Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского
 4 – Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
 5 – Институт проблем точной механики и управления РАН
 *e-mail: versetty2005@yandex.ru

Успешная плазмонная фототермическая терапия (ПФТТ) опухолей, сенситивизированных наночастицами, требует решения ряда задач, связанных с выбором протокола однократного или многократного введения наночастиц, дозой и распределением наночастиц в опухоли, а также дозой облучения. Очевидно, что знание оптических параметров опухолевой ткани является ключевым моментом как для оценки дозы облучения, так и для оценки пространственного распределения лазерного излучения в опухолевой ткани в процессе ПФТТ.

В данной работе исследованы изменения оптических параметров модельных опухолей крыс, допированных золотыми наночастицами и подвергнутых ПФТТ. Для исследования были синтезированы золотые наностержни (ЗНС) размером около 41 на 10 нм. Для получения модельных опухолей крысам подкожно вводили суспензию клеток холангиокарциномы. Мониторинг развития кровеносной системы опухоли проводился с помощью ультразвукового доплеровского исследования. После достижения опухолями объема приблизительно 3 см³ крысы разделялись на 3 группы по 2 крысы в каждой. Если васкуляризация опухолей была достаточной, крысам I группы вводились три ежедневные внутривенные инъекции ЗНС с концентрацией 400 мкг/мл за 48 и 24 часа до проведения ПФТТ. Во II группе инъекции ЗНС вводились за час до эксперимента интратуморально в трех точках со скоростью введение 0.1 мл/мин. Для облучения использовали диодный лазер LS-2-N-808-10000 (LaserSystems, Ltd., Россия) с длиной волны 808 нм. Мониторинг изменения температуры в процессе облучения проводился с помощью тепловизора с интервалом 30 с. До и после облучения регистрировались спектры обратно рассеянного излучения целевой опухоли *in vivo*. III группу составляли крысы, которые не подвергались ПФТТ. Сразу после проведения ПФТТ крысы всех групп выводились из эксперимента и проводился забор тканей опухоли. Опухоли разделялись на следующие слои: кожа над опухолью, подкожная ткань, капсула опухоли, верхняя периферическая часть опухоли, некротическое ядро и нижняя периферическая часть опухоли. Образцы, соответствующие слоям опухоли, помещались между двумя предметными стеклами, после чего в диапазоне длин волн 350–2000 нм регистрировались спектры полного пропускания и диффузного отражения с помощью спектрометра с интегрирующей сферой. При решении обратной задачи методом инверсного Монте-Карло для опухолевых тканей были рассчитаны коэффициенты поглощения и транспортный коэффициент рассеяния.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и ННФИ в рамках научного проекта № 20-52-56005 и гранта по Постановлению Правительства Российской Федерации № 220 от 09 апреля 2010 г. (Соглашение № 075-15-2021-615 от 04.06.2021 г.).

ФОТОИНДУЦИРОВАННАЯ АНИЗОТРОПНАЯ БЕЗЫЗЛУЧАТЕЛЬНАЯ РЕЛАКСАЦИЯ МОЛЕКУЛ NADH В РАСТВОРАХ РАЗЛИЧНОЙ ВЯЗКОСТИ И ПОЛЯРНОСТИ
Photoinduced anisotropic nonradiative relaxation in NADH in solutions of various viscosity and polarity

Иоанна Горбунова*, Максим Сасин, Александр Семенов, Ярослав Бельтюков, Олег Васютинский

ФТИ им. А.Ф. Иоффе
 *e-mail: i.gorbunova@mail.ioffe.ru, тел. +7 9679672391

Исследование динамики возбужденных состояний биологических молекул методом спектроскопии «накачки-зондирования» при возбуждении фемтосекундными лазерными импульсами позволяет достичь ранее недоступного уровня понижения сложных биохимических процессов [1, 2]. Сообщается о разработке нового метода спектроскопии с субпикосекундным временным разрешением, основанного на схеме «накачки зондирования» с модуляцией поляризации пучка накачки. Отличительными особенностями данного метода является высокочастотная модуляция поляризации последовательности импульсов накачки на частоте 100 кГц с последующим выделением анизотропного вклада в сигнал с использованием высокочувствительной балансной схемы детектирования и синхронного усилителя. Метод был апробирован для исследования анизотропной релаксации в первом возбужденном состоянии кофермента NADH (восстановленный никотинамид аденин динуклеотид) в водных растворах этанола и пропиленгликоля. Впервые был зарегистрирован сигнал разностного поглощения в NADH при возбуждении фемтосекундными импульсами с энергией порядка 1 нДж, обусловленный линейным дихроизмом, с временным разрешением порядка 0.3 пс.

В результате анализа полученных экспериментальных сигналов были определены время анизотропной колебательной релаксации τ_{vib} , с характерной величиной 2–30 пс, и время вращательной диффузии τ_{rot} , лежащее в диапазоне 150 пс – 6 нс. При этом время вращательной диффузии хорошо согласуется с данными, полученными из наших экспериментов по исследованию затухания поляризованной флуоресценции [3]. Было получено, что время анизотропной колебательной релаксации τ_{vib} линейно возрастает с увеличением концентрации этанола или пропиленгликоля в растворе, при этом оно обратно пропорционально диэлектрической проницаемости (полярности) раствора. В свою очередь, зависимость времени вращательной диффузии от концентрации этанола и пропиленгликоля в растворе имеет нелинейный характер. При малых концентрациях этанола в растворе (менее 40%) время вращательной диффузии пропорционально вязкости раствора, тогда как при более высоких концентрациях наблюдается отклонение от прямой пропорциональности. Для раствора пропиленгликоля время вращательной диффузии пропорционально вязкости для всех концентраций. Для интерпретации экспериментальных была разработана модель, описывающая процесс анизотропной релаксации в терминах скалярных и векторных свойств дипольных моментов перехода и на основе приближения Борна-Оппенгеймера.

Работа была поддержана фондом РФФИ (грант № 18-03-00038 А)

1. N. E. Henriksen and V. Engel., *Int. Rev. Phys. Chem.*, 20 № 2, 93–126 (2014)
2. M. C. Fischer, J. W. Wilson, F. E. Robles, and W. S. Warren, *Rev. Sci. Instr.*, 87 (2016)
3. M. E. Sasin, I. A. Gorbunova, N. O. Bezverkhniy, Y. M. Beltukov, O. S. Vasyutinskii, and Rubayo-Soneira J., *Tech. Phys. Lett.*, 45, 672 (2019)

ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВОЙ ОБОЛОЧКИ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ С ЭРИТРОЦИТАМИ

The effect of the protein coat on the interaction of nanoparticles with erythrocytes

Анна Доронкина¹, Наталия Казадаева¹, Екатерина Козлова¹,
Ирина Янина¹, Александр Скапцов¹, Юлия Конюхова¹, Александр Правдин¹,
Вячеслав Кочубей¹, Артём Мыльников²

1 – Саратовский национальный исследовательский государственный университет
им. Н. Г. Чернышевского
2 – Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского
*e-mail: annador95@bk.ru

Экспериментальное исследование было выполнено на белых беспородных половозрелых крысах-самцах на базе Центра коллективного пользования НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии СГМУ им. В. И. Разумовского. Работа с лабораторными животными велась в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных и с соблюдением European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 18.03.1986).

В данной работе использовались синтезированные нами покрытые цитратом натрия апконверсионные наночастицы $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$. Синтезированные частицы обладают липофильными свойствами [1]. Для повышения интенсивности люминесценции удаления цитрата с поверхности частицы прогревались при температуре 500°C. По нашим данным, удаление цитрата с поверхности не влияет на их липофильные свойства.

Взвесь наночастиц вводилась непосредственно в кровяную систему крысы с последующим забором крови и выделением эритроцитов для визуальной оценки взаимодействия эритроцитов с наночастицами. Кроме того, в эритроцитарную массу, полученную из стабилизированной гепарином крови крысы, добавлялся раствор альбумина в физиологической концентрации и инкубировался с добавленными наночастицами.

В образцах с альбумином на наночастицах образуется белковая оболочка, которая влияет на взаимодействие наночастиц с эритроцитами. В данном эксперименте не наблюдалось захвата эритроцитами наночастиц, вследствие чего не образуются агрегаты и не наблюдается изменение формы эритроцитов. Однако, в эксперименте, когда раствор наночастиц вводился в кровяную систему крысы, образующаяся оболочка из белков присутствующих в плазме крови, не препятствовала взаимодействию наночастиц с эритроцитами, в результате чего образовывались эхиноциты и агрегаты из эритроцитов.

Для предотвращения захвата наночастиц эритроцитами, необходимо создание стабильной оболочки из альбумина на поверхности наночастиц.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (Грант № 19-12-00118).

1. A. Dong, X. Ye, J. Chen, Y. Kang, T. Gordon, J. M. Kikkawa, C. B. Murray Generalized Ligand-Exchange Strategy Enabling Sequential Surface Functionalization of Colloidal Nanocrystals // *Journal of the American Chemical Society*. – 2011. – Vol. 133, N. 4. – P. 998–1006

ВЛИЯНИЕ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ НА ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ БИОТКАНИ ПО СПЕКТРУ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ АПКОНВЕРСИОННЫХ НАНОЧАСТИЦ ЧЕРЕЗ СЛОЙ БИОТКАНИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ

Influence of intravenous administration of nanoparticles on determination of biological tissue temperature from the luminescence spectrum of upconversion nanoparticles through a biological tissue layer under various conditions

Наталия Казадаева¹, Анна Доронкина¹, Екатерина Козлова¹,
Ирина Янина¹, Александр Скапцов¹, Юлия Конюхова¹, Александр Правдин¹,
Вячеслав Кочубей¹, Артём Мыльников²

1 – Саратовский национальный исследовательский государственный университет
им. Н. Г. Чернышевского
2 – Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского
*e-mail: kazadaevani@mail.ru

Апконверсионные наночастицы могут применяться для определения температуры в биообъектах [1, 2]. В данной работе проводится исследование зависимости погрешности определения температуры биологической ткани по люминесценции апконверсионных наночастиц через слой биоткани от типа биологической ткани, внутривенного введения наночастиц и глубины залегания наночастиц в биоткани.

Для определения температуры биологической ткани, использовались синтезированные нами апконверсионные частицы $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{Er}$, покрытые оболочкой SiO_2 . В качестве биологического объекта использовались тонкие срезы кожи, жировой ткани, мышечной ткани и раковой опухоли крыс *in vitro*. Толщина биоткани варьировалась в диапазоне 0,186–2,89 мм. Образцы ткани были получены от крыс, которым вводили различные дозы наночастиц, крыс с выращенными раковыми опухолями, а также от контрольных крыс. Регистрация спектра апконверсионной люминесценции частиц, находящихся под слоем биоткани проводилась при помощи спектрометра QE6500 FL (Ocean Optics, США).

Температура биоткани определялась по величине натурального логарифма отношений интенсивностей люминесценции апконверсионных частиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{Er}$ под слоем биоткани на длинах волн $\lambda_1 = 519$ нм и $\lambda_2 = 538$ нм, который обратно пропорционален абсолютной температуре частиц. Для расчета применялись калибровочные коэффициенты для данных наночастиц, рассчитанные ранее [3].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (Грант № 19-12-00118).

1. I. Yu. Yanina, E. A. Sagaidachnaya, J. G. Konyukhova, A. A. Skaptsov, N. I. Kazadaeva, A. A. Doronkina, A. B. Pravdin, V. I. Kochubey, V. V. Tuchin, "Experimental study of the dependence of the distortion of the luminescence spectra of upconversion nanoparticles on the depth of their location in biological tissue," *Proc. SPIE 11641, Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics XVIII*, 116410W (5 March 2021)
2. И.Ю.Янина, Е.К.Волкова, Е.А.Сагайдачная, В.И.Кочубей, В.В.Тучин, Влияние рассеяния света на определение температуры биологической ткани по спектрам фотолюминесценции ап-конверсионных наночастиц // *Квантовая электроника*, 2019, Т.49, № 1, С. 59–62
3. Сагайдачная Е.А. Люминесцентные свойства апконверсионных частиц $\text{NaYF}_4:\text{Er}, \text{Yb}$ и перспективы их применения в качестве термодатчиков, дис. ... канд. физ.-мат. наук:01.04.05 / Саратовский государственный университет, 2020. – 113 с

**ЛАЗЕРНАЯ АКТИВАЦИЯ РАСТВОРЕННОГО КИСЛОРОДА
В ЕСТЕСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ**
Laser activation of dissolved oxygen under natural conditions

Александр А. Красновский

Федеральный исследовательский центр биотехнологии» РАН, 119071 Москва, Россия
*e-mail: phoal@mail.ru

В докладе суммированы многолетние результаты исследований группы автора по лазерной активации растворенного кислорода в естественных условиях. Данные получены путем измерения скоростей химического захвата синглетного кислорода и интенсивности его собственной фосфоресценции. исследована активация кислорода в аэрированных органических растворителях при действии лазерного облучения в интервале длин волн 600–1300 нм. Обнаружено два главных максимума спектра действия активации кислорода при 765 и 1273 нм, и два в 15–100 раз меньшие по интенсивности максимума при 690 и 1070 нм. Все обнаруженные максимумы соответствуют полосам поглощения газообразного кислорода в атмосфере Земли. При действии красного света 630 нм достоверной генерации синглетного кислорода обнаружить не удалось. На основе этих данных измерены спектры поглощения кислорода, растворенного в органических растворителях и воде в нормальных условиях. Обсуждаются результаты сравнения полученных абсорбционных коэффициентов кислорода с аналогичными коэффициентами в атмосфере Земли и сжатом кислороде. Подробная информация приводится в цитированных ниже публикациях и указанных в них ссылках.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 19-04-00331 А и госзаданием ФИЦ Биотехнологии РАН.

1. Krasnovsky A.A., Kozlov A.S. New approach to measurement of IR absorption spectra of dissolved oxygen molecules based on photochemical activity of oxygen upon direct laser excitation // *Biofizika*, 2014, 59, 250–257
2. Krasnovsky A.A., Kozlov A.S. Photonics of dissolved oxygen molecules. Comparison of the rates of direct and photosensitized excitation of oxygen and reevaluation of the oxygen absorption coefficients // *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, 2016, 329, 167–174
3. Krasnovsky A.A., Kozlov A.S. Laser photochemistry of oxygen. Application to studies of the absorption spectra of dissolved oxygen molecules // *J. Biomed. Photonics & Engineering*, 2017, 3, 010302: 1–10
4. Krasnovsky A. A., Benditkis A.S., Kozlov A. S. Kinetic Measurements of Singlet Oxygen Phosphorescence in Hydrogen-Free Solvents by Time Resolved Photon Counting // *Biochemistry (Moscow)* 2019, 84, 153–163
5. Krasnovsky A.A., Kozlov A.S., Benditkis A.S. Comparison of Photodynamic Activities of Molecular Oxygen and Porphyrins // *Macroheterocycles*, 2019, 12, 171–180
6. Krasnovsky A. A. Photonics of Molecular Oxygen in Aqueous Solutions // *Physics of Wave Phenomena*, 2020, 28, 116–134
7. Kozlov A.S., Egorova O.N., Medvedkov O.I., Krasnovsky A.A. Activation of oxygen molecules by 1070 nm laser radiation in aerated solvents // *Optics Lett.* 2021, 46, No. 3/1, 556–559

**ДЕЙСТВИЕ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ НА СВОБОДНЫЕ И ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ
ОБРАЗЦЫ ПАПАИНА, ФИЦИНА И БРОМЕЛИНА**
The effect of UV radiation on free and immobilized papain, ficin and bromelain

С. М. Панкова, И. С. Нехаев, П. А. Дьяченко, М. Г. Холявка, В. Г. Артюхов

Воронежский государственный университет
*e-mail: sazykina.93@mail.ru, тел. +79204509532

Для лечения гнойных ран и ожогов широкое применение приобрели цистеиновые протеазы: папаин, фицин, бромелин [1]. Хитозан и его производные обеспечивают возможность образования между полимером-носителем и ферментом связей различной прочности, что создает предпосылки для регулирования активности и стабильности ферментов, а также скорости их диффузии в рану. Комплексное использование УФ-облучения, цистеиновых протеаз и хитозана может помочь быстрее восстановить рану или ожог и сократить время заживления кожи. Нашей целью было изучение влияния ультрафиолетового излучения на фотомодуляцию активности бромелина, фицина и папаина как свободных, так и иммобилизованных на матрице хитозана.

В качестве объектов исследования были выбраны фицин, папаин, бромелин фирмы «Sigma-Aldrich», субстратом для гидролиза служил бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы «Sigma-Aldrich», носителями для иммобилизации – два вида хитозана, синтезированных ЗАО «Биопрогресс»: пищевой хитозан и сукцинат хитозана. Иммобилизацию протеаз осуществляли адсорбционным методом [2]. Определение количества белка в препаратах и активности протеаз осуществляли модифицированным методом Лоури [3]. УФ-облучение растворов свободных и иммобилизованных протеаз проводили при их непрерывном перемешивании магнитной мешалкой в термостатируемой кювете ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240–390 нм. Дозы облучения составляли: 151, 453, 755, 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м².

Установлено, что по степени фоточувствительности цистеиновые протеазы можно расположить в следующий ряд: бромелин → фицин → папаин. Иммобилизация на матрице хитозана приводит к повышению стабильности гетерогенных биокатализаторов по отношению к УФ-облучению по сравнению со свободными ферментами. Результаты нашего исследования свидетельствуют о фотопротекторном эффекте матрицы хитозана, который может быть обусловлен следующими причинами: молекулы папаина, фицина и бромелина при взаимодействии с матрицей хитозана образуют фоторезистентные комплексы; молекулы хитозана экранируют активные фотопродукты свободнорадикальной природы, предотвращая фотоокисление определенного числа аминокислот изученных ферментов при воздействии УФ-облучения.

1. Holyavka M., Pankova S., Koroleva V., Vyshkvorkina Y., Lukin A., Kondratyev M., Artyukhov V. Influence of uv radiation on molecular structure and catalytic activity of free and immobilized bromelain, ficin and papain. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2019, V. 201, P. 111681
2. Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Беленова А.С. Разработка методики получения гетерогенного биокатализатора на основе трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана. *Фундаментальные исследования*, 2013, № 11 (часть 3), С. 484–487
3. Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Беленова А.С. Подбор методики количественного определения трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана, и его каталитической активности. Вестник ВГУ. Серия: «Химия. Биология. Фармация», 2013, № 2, С. 116–119

СЕКЦИЯ 6. БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ И ФОТОНИКА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ

КАЛЬЦИЙ-РЕГУЛИРУЕМЫЕ ФОТОПРОТЕИНЫ, АКТИВИРОВАННЫЕ РАЗЛИЧНЫМИ АНАЛОГАМИ ЦЕЛЕНТЕРАЗИНА Ca²⁺-regulated photoproteins activated with various coelenterazine analogues

Елена Еремеева^{1,2*}, Наталья Маликова¹, Дмитрий Гульнов², Евгений Высоцкий¹

1 – Институт биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, 660036, Россия

2 – Сибирский федеральный университет, Красноярск, 660041, Россия

*e-mail: l_ermeeva@mail.ru; Тел: +7-391-249-4430

Биоломинесценция многих морских организмов осуществляется за счет Ca²⁺-регулируемых фотопротеинов, которые представляют собой стабильный фермент-субстратный комплекс, состоящий из апофотопротеина (~22 kDa) и молекулы преактивированного кислородом субстрата – 2-гидропероксицелентеразина [1]. Являясь яркими представителями семейства «EF-hand» белков, при связывании ионов кальция фотопротеины претерпевают конформационные изменения, запускающие реакцию окислительного декарбоксилирования 2-гидропероксицелентеразина, в результате которой образуется целентерамид в возбужденном состоянии и CO₂ [2]. Переход целентерамида из возбужденного состояния в основное сопровождается излучением кванта света.

С момента открытия целентеразина было синтезировано большое количество его аналогов в попытках получить модифицированные люциферины с более высокой интенсивностью биоломинесценции, измененной кинетикой реакции, иными спектральными и другими полезными свойствами [1, 3]. Однако, несмотря на значительные успехи в этой области, подробная информация о влиянии модификаций различных групп целентеразина на биоломинесцентные свойства фотопротеинов довольно отрывочна и часто противоречива.

В данной работе было исследовано влияние модификации ядра молекулы целентеразина, а также различных модификаций 6-(п-гидрокси)-фенильной, 2-(п-гидрокси)-бензильной и 8-бензильной групп на биоломинесценцию двух известных Ca²⁺-регулируемых фотопротеинов, акворина и обелина, и ряда их мутантов. Среди изученных свойств – удельная биоломинесцентная активность, быстрая кинетика биоломинесцентной реакции, время-разрешенная флуоресценция, константа диссоциации образования фотобелкового комплекса, чувствительность к кальцию, спектры биоломинесценции и флуоресценции. На основании экспериментальных данных выделено несколько групп целентеразина, которые представляются важными для биоломинесценции фотопротеинов. Также было показано, что аминокислотное микроокружение молекулы целентеразина, связанной в активном центре биоломинесцентного белка, может быть ключевым фактором в наблюдаемых характеристиках некоторых аналогов целентеразина.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и ГФЕН Китая в рамках научного проекта № 20-54-53011, РФФИ, Правительства Красноярского края и Красноярского краевого фонда науки в рамках научного проекта № 20-44-240006, а также РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-00085.

1. Shimomura O., Johnson F.H. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1978, 75 (6), 2611–2615
2. Vysotski E.S., Lee J., *Acc. Chem. Res.*, 2004, 37 (6), 405–415
3. Jiang T.; Du L.; Li M. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2016, 15 (4), 466–480

ВАРИАНТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОНЦЕВЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ В Ca²⁺-РЕГУЛИРУЕМЫХ ФОТОПРОТЕИНАХ НА ПРИМЕРЕ ОБЕЛИНА И БЕРОВИНА. Variants of the interaction of terminal amino acid residues of Ca²⁺-regulated photoproteins by the example of obelin and berovin

Людмила Буракова*, Елена Еремеева, Евгений Высоцкий

ФГБНУ ФИЦ КНЦ СО РАН ИБФ СО РАН

*e-mail: burakoval@mail.ru, тел. +7 923 2894558

Ca²⁺-регулируемые фотопротеины, ответственные за свечение медуз и гребневиков, представляют собой компактные глобулы с субстратом во внутренней полости. В обелине стабильность фотопротеинового комплекса обеспечивает образование двух водородных связей между С-концевым остатком Pro и Arg21 [1]. Замена Arg21 является критичной для стабильности белка [2]. В беровине С-концевым аминокислотным остатком является Туг. Его делеция или замена приводит к потере способности образовывать фотопротеиновый комплекс. Замена ни одного из 4-х остатков Arg в первой α-спирали беровина не повлияла на свойства белка, тогда как замена Tyr13 на любые другие остатки, кроме Phe, препятствовала формированию комплекса. По-видимому, между фенильными кольцами Tyr13 и Tyr208 существует π – π взаимодействие [3]. Добавление С-концевого Pro в молекулу беровина показало, что при этом фотопротеиновый комплекс формируется, однако его стабильность на два порядка ниже, чем у беровина дикого типа. Мы предположили возможность образования водородной связи между Pro209 и одним из 4-х Arg первой α-спирали, как это происходит в обелине. Однако снижение биоломинесцентной активности до 0.05% от таковой беровина дикого типа может свидетельствовать о неправильной координации субстрата в данном варианте взаимодействия. В присутствии замен Y13R и Pro209 комплекс образуется, но выход активного белка в 2 раза ниже, чем при наличии только Pro209, а удельная активность почти на порядок выше. Образование водородной связи между Pro209 и Arg13 также возможно, но, вероятно, из-за более длинного N-концевого участка в беровине по сравнению с обелином, она может менее эффективно стабилизировать фотопротеиновый комплекс, чем π–π взаимодействие. Мутант с заменами F13R/Y208P показал выход активного белка около 30% и при этом продемонстрировал достаточно высокую фото- и термостабильность по сравнению как с беровином дикого типа, так и с другими мутантами по этим позициям, что может свидетельствовать о формировании водородной связи между Arg и Pro, как это происходит в обелине. Однако его удельная активность составила всего 0.1% от таковой беровина. Таким образом, основной гипотезой механизма формирования внутренней полости беровина пока остается π–π взаимодействие.

Работа была поддержана фондом РФФИ (грант № 20-04-00085)

1. Liu ZJ, Vysotski ES, Chen CJ, Rose JP, Lee J and Wang BC. Structure of the Ca²⁺-regulated photoprotein obelin at 1.7 Å resolution determined directly from its sulfur substructure. *Protein Sci.*, 2000, 9, 2085–2093
2. Eremeeva EV, Burakova LP, Krasitskaya VV, Kudryavtsev AN, Shimomura O, Frank LA. Hydrogen-bond networks between the C-terminus and Arg from the first α-helix stabilize photoprotein molecules. *Photochem Photobiol Sci.*, 2014, 13, 541–547
3. Burakova LP, Eremeeva EV, Vysotski ES. The interaction of C-terminal Tyr208 and Tyr13 of the first α-helix ensures a closed conformation of ctenophore photoprotein berovin. *Photochem Photobiol Sci.*, 2020, 19, 313–323

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦЕЛЕНТЕРАЗИН-ЗАВИСИМЫХ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ

Structural studies of coelenterazine-dependent bioluminescence proteins

Е. С. Высоккий*, П. В. Наташин, Л. П. Буракова, С. В. Маркова, Е. В. Еремеева, Н. П. Маликова, М. Д. Ларионова

Лаборатория фотобиологии, Институт биофизики СО РАН, Федеральный исследовательский центр КНЦ СО РАН, Красноярск
*e-mail: Eugene.vysotski@gmail.com, тел. +7 913 5146176

Биоломинесценция – явление, широко представленное в природе. Светящиеся организмы встречаются среди бактерий, грибов, простейших, кишечнорастворимых, червей, моллюсков, насекомых и рыб. В настоящее время насчитывается несколько тысяч биоломинесцентных видов среди представителей более чем 700 родов. Исследования биоломинесцентных систем различных организмов показали, что, несмотря на одинаковый конечный результат – излучение кванта света в видимом диапазоне спектра, механизмы, лежащие в основе этого процесса, значительно различаются у представителей различных таксонов. Разнятся не только субстраты и кофакторы, вовлеченные в реакции биоломинесценции, но и катализирующие их ферменты. Поэтому термины «люцифераза» и «люциферин» – понятия скорее собирательные и функциональные, чем структурно-химические. Хотя изучение биоломинесцентных белков различных организмов имеет фундаментальное значение, основной движущей силой, определяющей интерес к исследованию биоломинесценции, является возможность ее использования в качестве аналитического инструмента.

Среди нескольких субстратов светоизлучающих реакций, идентифицированных в морских светящихся организмах, наиболее часто в качестве люциферина используются целентеразин и его производные. Целентеразин-зависимые биоломинесцентные системы можно разделить на два типа. К первому относятся системы, в которых люцифераза – типичный фермент, катализирует окислительное декарбоксилирование целентеразина с образованием продукта, целентерамида, в возбужденном состоянии. К другому типу относятся Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины, ответственные за свечение морских гидромедуз и ктенофор. Фотопротеины – уникальный класс биоломинесцентных белков. По сути, Ca^{2+} -регулируемый фотопротеин представляет собой стабильный фермент-субстратный комплекс, состоящий из апобелка и прочно, но нековалентно связанного с ним активированного кислородом целентеразина (2-гидропероксицелентеразина). Связывание ионов кальция с белком инициирует заключительную стадию биоломинесцентной реакции – декарбоксилирование 2-гидропероксицелентеразина, приводящее к образованию связанного с белком целентерамида в возбужденном состоянии, переход которого в основное состояние сопровождается излучением света.

К настоящему времени определены пространственные структуры нескольких целентеразин-зависимых биоломинесцентных белков: Ca^{2+} -регулируемых фотопротеинов кишечнорастворимых в различных конформационных состояниях, а также их мутантов, люцифераз из коралла *Renilla reniformis*, креветок *Oplophorus gracilirostris* и копепод *Gaussia princeps*. Несмотря на использования одного и того же субстрата и одинаковый механизм биоломинесцентных реакций, оказалось, что пространственные структуры белков полностью отличаются. В данной работе на примере Ca^{2+} -регулируемых фотопротеинов показана важность определения структуры белка для выяснения функциональной роли аминокислот активного центра в каталитическом окислении субстрата и в формировании эмиттера.

Работа поддержана грантом РФФИ №20-04-00082.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ФИТОГОРМОНОВ И СТЕРОИДОВ РЫБ НА ПОКАЗАТЕЛИ РОСТА, БИОСИНТЕЗА И НАКОПЛЕНИЯ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ: ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ АНАЛИЗ МЕТАБОЛИЗМА ЛИПИДОВ И МНОГОФАКТОРНЫЙ СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИНДУКЦИИ

Physiological effects of phytohormones and fish steroids on the growth, biosynthesis, and accumulation of economically significant secondary metabolites of green algae: transcriptional analysis of lipid metabolism and multivariate statistical analysis of induction

Татьяна Козлова^{1*}, Роман Волошин¹, David B Levin³, Сулейман Аллахвердиев^{1,2}

1 – Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

2 – Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Россия

3 – University of Manitoba, 66 Chancellors Cir, Winnipeg, MB, Canada

*e-mail: kozlova@ifr.moscow

Поиск путей одновременного повышения выработки биомассы и накопления ценных биомолекул является одной из основных целей биотехнологии биомасс. Сравнительно недавно было показано на различных видах микроводорослей, что экзогенные гормоны растительного и животного происхождения способны одновременно повышать продуктивность биомассы и выработку биомолекул на клетку. Однако, как механизм проникновения экзогенные гормонов в клетку водоросли, так и внутриклеточный механизм воздействия гормона на физиологию клетки мало исследованы.

В наших исследованиях впервые проанализированы как количественный состав жирных кислот нейтральных липидов и пигментов, так и их профили в зависимости от типа гормона и его экзо-концентраций. Проанализированы схожесть и различия воздействия четырех фитогормонов (ИУК, АБК, ЭБЛ, БЛ) и двух стероидов (Е2, 17,20-Р) на клетки микроводоросли, связь показателей роста и накопления вторичных метаболитов методами многофакторного статистического анализа (анализа главных компонент (PCA) и анализа канонического соответствия (ССА)). Начата работа по транскрипционному анализу ключевых генов в путях биосинтеза липидов. Результаты показали, что все тестируемые гормоны в наноконцентрациях способны к одновременному стимулированию показателей роста и биосинтеза/аккумуляции ценных для применения в промышленности биомолекул. Однако степень воздействия различных гормонов, наиболее эффективные концентрации и наиболее подверженные влиянию гормона пути метаболизма отличались значительно между гормонами, прошедшими испытания на одинаковом штамме микроводоросли выращенном в одинаковых условиях. ИУК в наноконцентрациях 5 и 100 нМ стимулировала экспрессию генов, и изменила паттерны экспрессии генов связанных с биосинтезом жирных кислот. Результаты исследований показали возможность использования гормонов в биотехнологии для управления биосинтезом зеленых водорослей. Большинство испытаний комбинаций брассиностероида (БЛ) и ауксина (ИУК) продемонстрировали синергетическое влияние на физиологию *S. quadricauda*.

Работа была поддержана фондом РФФ (грант № 19-14-00118)

**ДЕЛЕЦИОННЫЕ МУТАНТЫ ЛЮЦИФЕРАЗЫ *METRIDIA LONGA* КАК
ПЕРСПЕКТИВНЫЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ РЕПОРТЕРЫ**
Deletion mutants of *Metridia longa* luciferase as promising bioluminescent reporters

Игорь Коротов*, Светлана Маркова

ФИЦ «КНЦ СО РАН», Институт Биофизики СО РАН, Красноярск
 *e-mail: igorkorotov@gmail.com, тел. +79135393413

Свойства биоломинесцентных репортеров, таких как высокая чувствительность, нетоксичность для объекта исследований и возможность наблюдать сигнал в реальном времени, позволили им найти широкое применение в биомедицинских исследованиях. Люциферазы – это собирательное наименование группы ферментов, катализирующие окисление субстрата кислородом с образованием квантов света. Данные ферменты независимо эволюционировали у представителей различных таксонов, вследствие чего структура, свойства и механизм их действия крайне разнообразны. На сегодняшний день клонировано и опробовано в качестве репортерных молекул около десятка типов биоломинесцентных белков. Вместе с тем поиск новых люцифераз и улучшение репортерных свойств уже существующих продолжается. Новые открытия позволяют расширить области применения и получить широкий спектр репортеров с различными характеристиками, подходящих для решения разнообразных задач.

Небольшой размер, высокая яркость, термостабильность, отсутствие потребности в кофакторах выгодно выделяют люциферазу *Metridia longa* для использования *in vitro* и *in vivo* на фоне других репортерных белков [1]. Одна из изоформ люциферазы *Metridia*, MLuc7 размером всего 168 аминокислотных остатков (16.5 кДа) имеет наименьшие размеры среди известных природных люцифераз, что позволяет минимизировать метаболическую нагрузку на клетку-хозяина в исследованиях *in vivo*, уменьшить стерические и функциональные интерференции в случае использования репортера в составе фьюжин-белков, в том числе в качестве BRET-партнера.

Целью нашей работы было исследование возможности дальнейшего уменьшения размеров люциферазы MLuc7 как для исследования структуры каталитического домена, так и для получения полностью функционального биоломинесцентного репортерного белка с минимально возможными размерами. Для этого была получена серия делеционных мутантов MLuc7 люциферазы укороченных с N- и C-конца путём создания рекомбинантных плазмид с последующей трансформацией в клетки *E. coli*. Предварительная характеристика биоломинесцентной активности и термостабильности грубых лизатов бактериальных клеток позволила отобрать 2 варианта делеционных мутантов ML7-G28 (укорочен на 10 аминокислот) и ML7-28G4C (укорочен на 14 аминокислот), как наиболее перспективные для практического применения. В ходе исследования были оптимизированы процедуры фолдинга и очистки из клеток *E. coli* рекомбинантных укороченных люцифераз для получения высококачественных препаратов, использованных в дальнейшем для характеристики их люминесцентных свойств. Показано, что исследуемые делеционные мутанты ML7-G28 и ML7-28G4C, могут оказаться перспективными биоломинесцентными репортерами, наименьшими из известных на сегодняшний момент.

Работа выполнена при поддержке совместного гранта № 20-44-242003\20, предоставленного РФФИ, Правительством Красноярского края и Краевым фондом науки.

1. Markova, S.V. Shining light on the secreted luciferases of marine copepods: current knowledge and applications. / S.V. Markova, M.D. Larionova, E.S.Vysotski // *Photochem Photobiol.* – 2019. – V. 95(3). – P. 705–721

**БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ БИОТЕСТЫ ДЛЯ
ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА И ОБРАЗОВАНИЯ**

В. А. Кратасюк^{1,2}

1 – Сибирский федеральный университет, Красноярск
 2 – Институт биофизики СО РАН, Красноярск
 *e-mail: valkrat@mail.ru

Исторически применение биоломинесценции в токсикологии началось с использования светящихся бактерий, и они до сих пор широко используются. В отличие от классических тестируемых объектов, таких как парameции, водоросли, дафнии и т.п., анализ в биотестах на светящихся бактериях происходит быстрее (<30 мин). Однако, как и в случае других организмов, светящиеся бактерии имеют много недостатков, связанных с использованием живых объектов. Так, трудности поддерживать стабильное состояние бактериальной культуры во время измерений и при хранении приводят к низкой точности измерения. При этом реакция бактерий на токсичные вещества неоднозначна и выражается как в уменьшении, так и в увеличении интенсивности светоизлучения, что часто приводит к неоднозначной интерпретации результатов. Из-за этих недостатков биотест на светящихся бактериях также не дает надежных результатов. Для решения проблем ферментативного анализа и биотестирования предлагается новый подход к разработке ферментативных биосенсоров, а также биотестов на токсичность. В противовес методам химического анализа, которые занимаются поиском в окружающей среде известных загрязнителей и токсичных веществ и сравнивают их концентрацию с ПДК, предлагаются методы ферментативного биотестирования, позволяющие решить проблему обнаружения неизвестных многочисленных химических соединений в окружающей среде, пищевых продуктах и др. объектах. Ферментативные биотесты дают интегральную оценку качества или загрязнения анализируемой среды и, также же как классические биотесты, показывают влияние вредных веществ на функции живых организмов (рыбы, водоросли, растения, дафнии, бактерии и т.д.), но в качестве тест объекта используют ферментативные реакции, отвечающие за биологические функции, например, дыхание, подвижность и т.д. Предложена новая методология комплексного ферментативного биотеста, предусматривающая замену живых организмов, используемых в качестве тест-систем в биотестах, на набор репрезентативных ферментативных систем, составляющих комплексных ферментативный биотест. Каждая из ферментативных систем моделирует, как правило, одну ключевую функцию организма. Выявлены принципы выбора ферментных систем исходя из задач исследования. Определены составы такого теста для исследования загрязнения городских и сельскохозяйственных почв, на основе специфического действия токсиантов на ферменты. Была разработана методология получения иммобилизованных реагентов «Энзимоллом», 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. Была разработана экспериментальная ферментативная модель организма (ФМО) как новый комплексный биотест для оценки качества почвы. ФМО используется также для мониторинга природных и промышленных водных экосистем, загрязнения воздуха, а также для анализа качества пищевых продуктов, разнообразных материалов, включая наноматериалы.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 16-14-10115.

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МИКРОАНАЛИЗ ВКЭ В ПРИРОДНЫХ КЛЕЩАХ Bioluminescent detection of tick-borne encephalitis virus in native ticks

Александр Н. Кудрявцев*, Людмила А. Франк

Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук» обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН

*e-mail: kirush07@mail.ru, тел. +79082157805

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) является возбудителем одной из самых тяжелых человеческих нейрозаболеваний. Этот вирус передается иксодиевыми клещами и широко распространен на евразийском континенте. ВКЭ передается из слюны инфицированных клещей в течение нескольких минут после укуса клеща, но в среднем только 5–10% клещей являются передающими ВКЭ-агентами.

В результате исследований разработана и испытана тест-система для выявления ВКЭ в клещах твердофазным биоломинесцентным иммуноанализом в высокопроизводительном микропланшетном варианте. В качестве сенсора использовали гибридный белок 14D5a-Rm7, состоящий из одноцепочечного мини-антитела к капсидному белку Е ВКЭ и модифицированной люциферазы *Renilla muelleri* [1]. В ходе работы оптимизированы условия получения и хранения компонентов набора по выявлению ВКЭ, составлен рабочий протокол проведения анализа. Испытания предложенной аналитической системы проводили в течение нескольких сезонов (Таблица 1), были проанализированы более чем 1100 природных клещей. Параллельно образцы были исследованы с помощью метода на основе ОТ-ПЦР либо колориметрического иммуноанализа (Вектор-Бест, Россия). Образцы отрицательного (К-) и положительного (К+) контролей взяты из набора Vector-Best D1154. Наличие вируса определяли по значению дискриминационного фактора Д, равного отношению биоломинесцентного сигнала от образца к сигналу контрольного негативного образца (К-). При значении $D \geq 2$ образец считали положительным по ВКЭ (ПС). Показано, что в качестве субстрата биоломинесцентной реакции вместо целентеразина в системе удобнее использовать целентеразин связывающей белок [2]. Чувствительность и специфичность анализа составила 89.5% и 98.9% (считая за 100% показатели колориметрического анализа).

Таблица 1. Результаты биоломинесцентного выявления ВКЭ в природных клещах

Год	Д, ОС/К-	Д, ПС/К-	К+/К-
2016	1,15±0,3(n=487)	2,77±0,8(n=15)	5,2±1,3(n=9)
2017	1,1±0,3(n=414)	5,3±1,1(n=4)	16,6±5,8(n=17)
2019	0,9±0,32(n=96)	6,84(n=1)	42,6±14,9(n=3)
2020	1,07±0,27(n=124)	3,17±1,02(n=4)	30,14±6,3(n=3)

Предложенный биоломинесцентный анализ не уступает по чувствительности колориметрическому и на основе ОТ-ПЦР, при этом быстрее первого, поскольку отсутствуют стадии добавления и инкубирования субстрата фермента, добавления стоп-реagenta, и существенно проще второго, поскольку не требует высокой квалификации персонала, ферментов и соблюдения особых условий проведения анализа.

1. Burakova LP, Kudryavtsev AN, Stepanyuk GA, Baykov IK, Morozova VV, Tikunova NV, Dubova MA, Lyapustin VN, Yakimenko VV, Frank LA. Bioluminescent detection probe for tick-borne encephalitis virus immunoassay. *Anal Bioanal Chem.*, 2015; 407:5417–5423
2. NA Kudryavtsev, LP Burakova, LA Frank. Bioluminescent detection of tick-borne encephalitis virus in native ticks. *Anal. Methods*, 2017, DOI: 10.1039/C7AY00535K

РАДИОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ. МОНИТОРИНГ С ПОМОЩЬЮ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ТЕСТОВЫХ СИСТЕМ Radioprotection properties of humic substances via bioluminescence monitoring

Nadezhda S. Kudryasheva^{1,2*}, Tatiana V. Rozhko³, Olga V. Kolesnik¹

1 – Institute of Biophysics SB RAS, Federal Research Center ‘Krasnoyarsk Science Center SB RAS’, 660036 Krasnoyarsk, Russia

2 – Siberian Federal University, Svobodny 79, 660041 Krasnoyarsk, Russia

3 – Krasnoyarsk State Medical Academy, 660022 Krasnoyarsk, Russia

*e-mail: n-qdr@yandex.ru, тел. +7 913 5613315

Luminous marine bacteria are proper candidates to study low-dose effects of radionuclides and radioprotective properties of different compounds.

It is known that microorganisms of soils and aqueous media are sensitive to the presence of humic substance (HS), products of natural decomposition of organic matter, which play a role of natural attenuators of environmental toxicity. Studying of low-intensity radiation effects in the presence of HS provides a basis for predicting a response of living organisms to radiation at large territories infected with low-intensity radiation after accidents, discharges of nuclear plants, or underground mining of natural resources.

We studied the combined effects of beta-emitting radionuclide tritium and HS on the marine unicellular microorganism – luminous bacteria – under conditions of low-dose radiation exposures (<0.04 Gy). Tritiated water, HTO, was used as a source of tritium. To imitate marine environment for bacterial cells and to balance osmotic processes, the 3% NaCl solutions were used.

The bioluminescence response of the marine bacteria to tritium corresponded to the “hormesis” model: it included stages of bioluminescence inhibition and activation, as well as the absence of the effect. HS were shown to decrease the inhibition and activation effects of tritium. Correlations between the bioluminescence intensity and the content of Reactive Oxygen Species (ROS) were found in the radioactive bacterial suspensions.

The results demonstrate an important role of HS in natural processes in the regions of low radioactive contamination: HS can mitigate radiotoxic effects and adaptive response of microorganisms to low-dose radioactive exposures. The involvement of ROS in these processes was demonstrated.

The high potential of the luminous marine bacteria to study radioprotective properties of bioactive compounds was demonstrated.

ГИБРИДНЫЕ БЕЛКИ НА ОСНОВЕ ЛЮЦИФЕРАЗЫ METRIDIA КАК СЕНСОРЫ ДЛЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО ИММУНОАНАЛИЗА Hybrid proteins based on Metridia luciferase serve as reporters for bioluminescent immunoassays

Марина Ларионова^{1*}, Светлана Маркова^{1,2}, Евгений Высоцкий¹

1 – ФИЦ «КНЦ СО РАН», Институт Биофизики СО РАН, Красноярск

2 – «Сибирский Федеральный Университет», Красноярск

*e-mail: larionova.marina@inbox.ru, тел. +73912494430

На сегодняшний день биоломинесцентные белки представляют собой удобные инструменты визуализации и активно применяются в технологиях имиджинга, проявляя чрезвычайно высокую чувствительность в *in vitro* и *in vivo* аналитических приложениях. Целентеразин-зависимые люциферазы и фотопотеины – привлекательные репортерные молекулы благодаря кофактор-независимой реакции, широкому линейному диапазону детекции и пределу обнаружения, достигающего аттомолей.

Люцифераза из копеподы *Metridia longa*, MLuc7 – естественно секретируемый фермент, катализирующий окисление целентеразина с испусканием голубого света. MLuc7 является наименьшей (16,5 кДа) люциферазой из всех известных на сегодняшний день, кроме того, обладает высокой удельной активностью, стабильностью, что делает ее перспективным биоломинесцентным репортером [1]. Небольшой размер люциферазы MLuc7 открывает возможности конструирования химерных молекул, минимизируя стерические препятствия и позволяя сохранить функциональную активность как специфичной, так и репортерной частей гибридного белка.

В настоящей работе мы оценили использование люциферазы MLuc7 при конструировании гибридных репортерных молекул, применимых для биоломинесцентного иммуноанализа. Методами генетического слияния были получены конструкции для синтеза люциферазы, соединенной через гибкие мостики (1) с одноцепочечным миниантителом 14D5a, специфичным к белку оболочки вируса клещевого энцефалита; (2) с мономерным стрептавидином; а также (3) zz-белком – элементом В-домена белка А. Рекомбинантные гибридные белки, полученные с помощью бакуловиральной экспрессии, а также выделенные путем рефолдинга из бактериальных телец включения, демонстрировали высокую биоломинесцентную активность вне зависимости от N' или C'-терминальной локализации люциферазного домена [2]. Все полученные репортерные белки были протестированы в рамках модельных биоломинесцентных твердофазных анализов для детектирования биотинилированного BSA (2), кроличьих IgG (3). Кроме этого, гибридный белок 14D5a-MLuc7 (1) был использован в качестве репортера для детекции вируса клещевого энцефалита на препаратах природных клещей.

Таким образом, нами был продемонстрирован высокий потенциал использования люциферазы MLuc7 как чувствительного репортера для разработки новых биоломинесцентных иммунологических анализов.

Работа выполнена при поддержке совместного гранта № 20-44-242003\20, предоставленного РФФИ, Правительством Красноярского края и Краевым фондом науки.

1. Markova, S.V., Larionova, M.D., Burakova, L.P., Vysotski, E.S. The smallest natural high-active luciferase: Cloning and characterization of novel 16.5-kDa luciferase from copepod *Metridia longa* // *BBRC.* – 2015, 457(1): 77–82
2. Larionova, M.D., Markova S.V., Tikunova N.V., Vysotski E.S. The smallest isoform of *Metridia longa* luciferase as a fusion partner for hybrid proteins // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020, 21:4971

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА НА ОСНОВЕ ЛЮЦИФЕРАЗЫ СВЕТЛЯКОВ И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВНЕШНИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА ЖИВЫЕ КЛЕТКИ Bioluminescent test-system based on firefly luciferase and its use to study external effects on living cells

Г. Ю. Ломакина^{1,2*}, Н. Н. Угарова¹

1 – Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, химический факультет

2 – МГТУ имени Э. Н. Баумана

*e-mail: lomakina@yahoo.com, тел. +7 926 6174080

Люциферазы светляков в качестве субстратов используют D-люциферин, АТФ и кислород. Рекомбинантные клетки, продуцирующие люциферазу светляков, были получены нами и использованы в качестве тест-систем для регистрации изменений содержания АТФ и люциферазы под действием эффекторов. Благодаря высокой активности и абсолютной специфичности к АТФ, люциферазы светляков широко используются в тест-системах для детекции АТФ – маркера жизнеспособности клетки. Благодаря прямой пропорциональности между содержанием АТФ и количеством жизнеспособных клеток в исследуемых образцах, по снижению уровня АТФ в присутствии различных стрессовых агентов (излучение, нагревание, добавки токсинов, антибиотиков) люциферин-люциферазный метод позволяет быстро детектировать изменения во внутриклеточных процессах, связанных с синтезом АТФ.

Тест-система на основе рекомбинантных клеток *E. coli*, продуцирующих термостабильную люциферазу светляков, была использована для изучения действия мембранно-активного антибиотика, колистина, на живые клетки *E. coli*. Анализ полученных зависимостей содержания люциферазы внутри (A_{in}) и вне (A_{ex}), а также концентрации АТФ внутри (ATP_{in}) и вне (ATP_{ex}) клеток от концентрации колистина и длительности инкубации в питательной среде LB и физрастворе показал, что с ростом концентрации колистина и длительности инкубации A_{in} и ATP_{in} быстро снижались, в то время как A_{ex} росло благодаря увеличению проницаемости цитоплазматической мембраны, достигая предельной величины ~30% от исходной величины ATP_{in} . Деградация же 70% ATP_{in} была объяснена тем, что колестин, проникая внутрь микробной клетки, дезорганизует систему синтеза АТФ, что приводит к гибели клетки. Сравнение ATP_{in} и ATP_{ex} при инкубации клеток в питательной среде и в физрастворе в отсутствие и в присутствии колистина показало, что более сильный бактерицидный эффект колестина оказывает на растущие, метаболически активные клетки, в то время как не растущие клетки, лишённые питания, оказываются более устойчивыми к действию антибиотика.

Клетки НЕК293, транзигентно трансфицированные плазмидой pcDNALuc, экспрессирующей люциферазу светляков, были использованы для изучения действия на них мембранно-активного агента - дигитонина, образующего комплексы с холестеринными мембранами, что приводит к образованию пор и высвобождению внутриклеточных компонентов в реакционную среду. Разработанная биоломинесцентная методика непрерывного слежения за данным процессом позволила в режиме реального времени регистрировать кинетические кривые накопления во внеклеточном пространстве люциферазы и АТФ в присутствии дигитонина. При концентрации $\leq 0,02$ мМ дигитонина наблюдался длительный период индукции, при этом белок не вытекал из клеток, но появились небольшие поры, проницаемые для низкомолекулярных соединений (АТФ). При повышении концентрации до 0,05 мМ индукционный период сокращался, быстро росла концентрация высвобождаемой люциферазы за счет образования крупных пор. Дигитонин наиболее токсичен для клеток при $\geq 0,08$ мМ, когда период индукции исчезает, и быстро достигается максимальная концентрация высвобождаемых белков.

Работа выполнена в рамках госбюджетной темы МГУ АААА-А21-121011290089-4.

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ОБЕЛИНА И АКВОРИНА С ЗАМЕНОЙ His, PHE (Tyr) и Trp ОКОЛО 6-(p-ГИДРОКСИ) ФЕНИЛЬНОЙ ГРУППЫ СУБСТРАТА
Bioluminescent properties of obelin and aequorin with substitution of His, Phe (Tyr) и Trp placed near the 6-(p-hydroxy) phenyl group of the substrate

Наталья Маликова*, Людмила Буракова, Евгений Высоцкий

Институт биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, 660036, Россия

*e-mail: npmal@yandex.ru, тел. +7 391 2494430

Ca²⁺-регулируемые фотопротейны морских кишечнорастных представляют собой стабильный фермент-субстратный комплекс из одноцепочечного (~22 kDa) белка – апофотопротейна и субстрата, преактивированного кислородом (2-гидроперокси-целентеразина). Биоломинесценция фотопротейнов инициируется связыванием трёх ионов кальция Ca²⁺-связывающими сайтами («EF-hands») с последующим декарбокислированием 2-гидропероксицелентеразина и образованием целентерамида в возбужденном состоянии и CO₂ [1], что приводит к испусканию кванта света.

Изучению роли отдельных аминокислотных остатков в биоломинесценции Ca²⁺-регулируемых фотопротейнов в последнее время уделяется много внимания. С помощью сайт-направленного мутагенеза получены разные мутантные варианты белков с измененными физико-химическими свойствами. К настоящему времени известны структуры акворина [2], обелина [3], клитина [4] и некоторых их лиганд-зависимых конформационных состояний [5, 6, 7]. Структуры всех фотопротейнов и, в частности, субстрат связывающих полостей сходны. Знание ключевых аминокислотных остатков, расположенных в активном центре близко к молекуле субстрата, сужает область исследования и делает их мишенью для мутагенеза. Одной из важных для биоломинесценции групп активного центра обелина является триада His22-Phe88-Trp92 (аналогичная триада в акворине: His16-Tyr82-Trp86), расположенная поблизости 6-р-гидроксифенильной группы целентеразина. Уже показано, что данные остатки участвуют в формировании эмиттера биоломинесценции и, соответственно, отвечают за спектральные характеристики свечения [7]. Однако, участие данных остатков в связывании субстрата и образовании активного фермент-субстратного комплекса не изучалось.

Данная работа сфокусирована на определении роли аминокислотных остатков триады His22-Phe88-Trp92 обелина и His16-Tyr82-Trp86 акворина в связывании целентеразина с апофотопротейном и образовании активного фотопротейнового комплекса. Для этого получен ряд мутантов обелина и акворина и изучены их основные биоломинесцентные свойства: удельная активность, скорость реакции, спектры излучения, кинетика образования фотопротейнового комплекса, связывание субстрата и выход активного фотопротейна в этом процессе. Полученные данные подтверждают важную роль данных аминокислот в образовании эмиттера биоломинесценции Ca²⁺-регулируемых фотопротейнов, а также активного фермент-субстратного комплекса.

Работа была поддержана фондом РФФИ (грант № 20-04-00085 А)

1. Vysotski E.S., Lee J., *Acc. Chem. Res.*, 2004, 37 (6), 405–415
2. Head J.F., Inouye S., Teranishi K., Shimomura O., *Nature*, 2000, 405, 372–376
3. Liu Z.-J., Vysotski E.S., Chen C.-J., Rose J.P., Lee J., Wang B.-C. *Protein Sci.*, 2000, 9, 2085–2093
4. Titushin M.S., Feng Y., Stepanyuk G.A., Li Y., Markova S.V., Goltz S., Wang B.-C., Lee J., Wang J., Vysotski E.S., Liu Z.-J., *J. Biol. Chem.*, 2010, 285, 40891–40900
5. Deng L., Markova S.V., Vysotski E.S., Liu Z.-J., Lee J., Rose J.P., Wang B.-C., *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 33647–33652
6. Deng L., Vysotski E.S., Markova S.V., Liu Z.-J., Lee J., Rose J.P., Wang B.-C., *Protein Sci.*, 2005, 14, 663–675
7. Liu Z.-J., Stepanyuk G.A., Vysotski E.S., Lee J., Markova S.V., Malikova N.P., Wang B.-C., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2006, 103, 2570–2575

ЛЮЦИФЕРАЗА КОПЕПОД *METRIDIA LONGA*: СТРУКТУРА И ПЕРСПЕКТИВЫ УЛУЧШЕНИЯ РЕПОРТЕРНОЙ ФУНКЦИИ
***Metridia longa* luciferase: structure and prospects for improving reporter function**

Светлана Маркова^{1,2*}, Марина Ларионова¹, Евгений Высоцкий¹

1 – ФИЦ «КНЦ СО РАН», Институт Биофизики СО РАН, Красноярск

2 – Сибирский Федеральный Университет, Красноярск

*e-mail: svetlana@ibp.ru, тел. +79029420682

Яркая голубая биоломинесценция морских копепоид *Metridia longa* обеспечивается секретлируемой люциферазой, катализирующей окисление субстрата целентеразина без каких-либо кофакторов. Люцифераза *M. longa* представлена целым рядом изоформ с различными свойствами размером 169–224 аминокислотных остатка, включая сигнальный пептид для секреции, с идентичностью последовательностей в диапазоне 54–99% [1]. Анализ последовательностей выявляет консервативную С-концевую часть, состоящую из двух неидентичных tandemных повторов с высококонсервативными 31-членными мотивами и вариабельный N-конец. Каждый из высококонсервативных мотивов содержит по 5 цистеиновых остатков, всего 10, что предполагает наличие до 5 дисульфидных связей на молекулу белка.

Для трех изоформ люциферазы *M. longa*, включая самую маленькую из известных люцифераз 16.5 kDa MLuc7, показано успешное применение в качестве высокочувствительных репортеров в *in vitro* и *in vivo* аналитических приложениях [2]. Но основными проблемами в более широком использовании данных репортеров остаются низкий температурный оптимум биоломинесцентной реакции в районе 12–18°C, протекание реакции по типу «вспышка», требующий люминометров со впрыском, и голубой диапазон излучаемого света, который интенсивно поглощается животными тканями. Также необходимо учитывать кооперативность копепоидных люцифераз в отношении субстрата при планировании экспериментов и анализе результатов.

В настоящей работе методы олигонуклеотид-направленного и случайного мутагенеза были использованы как для изучения каталитической функции люциферазы *M. longa*, так и для получения ряда люциферазных мутантов с улучшенными репортерными функциями. Отбор мутантов проводили на уровне колоний по нескольким критериям при использовании высокочувствительной имиджинговой системы. В результате получен ряд перспективных мутантов с диапазоном температурных оптимумов биоломинесцентной реакции в районе 23–28°C для применения *in vitro* и 32–37°C для применения *in vivo*, а также с замедленной кинетикой биоломинесцентной реакции. Методом делеций показано, что минимальный каталитический домен люциферазы *M. longa* формируют оба неидентичных tandemных повтора, в отличие от гомологичной люциферазы *Gaussia princeps*, для отдельных гомологичных повторов которой показано наличие существенной биоломинесцентной активности.

Работа выполнена при поддержке совместного гранта № 20-44-242003\20, предоставленного РФФИ, Правительством Красноярского края и Краевым фондом науки.

1. Маркова С.В., Высоцкий. Е.С. Целентеразин-зависимые люциферазы // *Биохимия*. – 2015, 80(6):845–866. (Engl: Markova S. V., Vysotski E. S. Coelenterazine-dependent luciferases // *Biochemistry (Mosc.)* – 2015, 80:714–732.)
2. Markova S.V., Larionova M.D., Vysotski E.S. Shining light on the secreted luciferases of marine copepods: current knowledge and applications // *Photochem Photobiol.* – 2019, 95(3):705–721

**ВЛИЯНИЕ ВОДОРОДНЫХ СВЯЗЕЙ, ФОРМИРУЕМЫХ N1-АТОМОМ
2-ГИДРОПЕРОКСИЦЕЛЕНТЕРАЗИНА С АМИНОКИСЛОТАМИ АКТИВНОГО
ЦЕНТРА БЕЛКА, НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА Ca^{2+} -РЕГУЛИРУЕМЫХ
ФОТОПРОТЕИНОВ МОРСКИХ КИШЕЧНОПОЛОСТНЫХ
Effect of hydrogen bond network formed by N1-atom of 2-hydroperoxycoelenterazine
with amino acids of the protein active center on bioluminescent properties of
hydromedusan Ca^{2+} -regulated photoproteins**

Павел Наташин*, Людмила Буракова, Евгений Высоцкий

Институт биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, 660036, Россия
*e-mail: pavelnatashin@mail.ru, тел. +7 391 2494430

Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины – биоломинесцентные белки, ответственные за свечение морских кишечнополостных животных. Акворин из медузы *Aequorea victoria* и обелин из гидроида *Obelia longissima* являются наиболее изученными представителями этого класса белков. Фотопротеины представляют собой прочный комплекс, состоящий из одноцепочечного полипептида и субстрата – преактивированного кислородом целентеразина (2-гидропероксицелентеразина). Связывание ионов кальция фотопротеином запускает реакцию декарбоксилирования субстрата с образованием продукта – целентерамида в возбужденном состоянии. Переход целентерамида в основное состояние сопровождается излучением света с λ_{max} в диапазоне 465–495 нм.

Определение пространственных структур фотопротеинов, а также исследования хемилюминесценции аналогов целентеразина и флуоресценции целентерамида в различных растворителях позволили сформулировать «proton-relay mechanism», который объясняет функциональную роль аминокислот активного центра фотопротеинов в реакции декарбоксилирования и в формировании эмиттера биоломинесцентной реакции [1]. Согласно предложенному механизму, молекула воды, находящаяся в субстрат-связывающей полости обелина у N1 атома 2-гидропероксицелентеразина и образующая водородные связи с остатками Tyr138 и His64, катализирует реакцию декарбоксилирования через протонирование аниона диоксиэтанона. Было предположено, что перенос протона от растворителя вероятнее всего происходит через «протонный канал», формируемый молекулами воды и аминокислотами активного центра белка [2].

Для проверки данного предположения с помощью сайт-направленного мутагенеза получены мутанты акворина и обелина с заменами аминокислот активного центра, расположенных в непосредственной близости от N1 атома 2-гидропероксицелентеразина, которые координируют молекулу воды внутри субстрат-связывающей полости фотопротеинов и формируют «протонный канал». Исследованы кинетика биоломинесцентной реакции полученных мутантов, а также их спектральные и биоломинесцентные свойства. Полученные результаты подтверждают предложенный «proton-relay mechanism» и детализируют функциональную роль аминокислот активного центра в биоломинесцентной реакции фотопротеинов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-04-00085.

1. Vysotski E.S., Lee J., *Acc. Chem. Res.*, 2004, 37, 405–415
2. Natashin P.V., Ding W., Ereemeeva E.V., Markova S.V., Lee J., Vysotski E.S., Liu Z.J., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 2014, 70, 720–732

**СТАДИЙНОСТЬ РАЗВОРАЧИВАНИЯ МОЧЕВИНОЙ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛЮЦИФЕРАЗ ДВУХ ТИПОВ
The stages of urea-induced unfolding of bacterial luciferases from two subfamilies**

Елена Немцева^{1,2*}, Дмитрий Гульнов¹, Лев Суковатый¹, Валентина Кратасюк^{1,2}

1 – Сибирский федеральный университет, Красноярск, 660041
2 – Институт биофизик СО РАН, Красноярск, 660036
*e-mail: enemtseva@sfu-kras.ru, тел. +7 391 2062072

Согласно филогенетическому анализу, все известные в настоящее время бактериальные люциферазы разбиваются на две высокоомологичные группы, различающиеся по структурным и функциональным свойствам [1]. В данной работе было исследовано разворачивание мочевиной люцифераз *Photobacterium leiognathi* и *Vibrio harveyi*, принадлежащих к разным группам. Были использованы оптические методы, включающие абсорбционную спектроскопию кругового дихроизма, стационарную и время-разрешенную флуоресценцию, а также электроферез в градиенте мочевины. Цель исследования состояла, с одной стороны, в сравнении конформационной стабильности двух бактериальных люцифераз из разных структурных подсемейств, а с другой – в сравнении информативности различных оптических методов для выявления стадий разворачивания белков. Для объяснения экспериментальных результатов был проведен анализ структурных характеристик белков вычислительными методами молекулярной динамики.

Было установлено, что оптическими методами могут быть обнаружены две стадии разворачивания из трех, описанных ранее в литературе [2]. Первый переход, соответствующий образованию неактивного димерного интермедиата люциферазы, происходит при концентрации мочевины <2 М и может быть зарегистрирован по изменению характеристик время-разрешенной флуоресценции белка. Второй переход – диссоциация субъединиц люциферазы, определяется только методом электрофереза в градиенте мочевины. Процесс разворачивания субъединиц люциферазы (третья стадия денатурации), происходящий при концентрации мочевины 3–5 М, оказался хорошо виден с помощью всех использованных методов. Сопоставление полученных экспериментальных данных с результатами молекулярного моделирования показало, что разница кривых перехода для двух белков обусловлена их структурой и не является следствием разного количества триптофановых остатков в их составе.

По результатам исследования был сделан вывод, что пути разворачивания одинаковы для двух белков. При этом переходы люциферазы *Photobacterium leiognathi*, хотя и происходят при более высокой (на ~0,5 М) концентрации мочевины, характеризуются большей шириной. Поэтому термодинамические параметры, рассчитанные на основе полученных данных, говорят о том, что структура люциферазы *Vibrio harveyi* обладает большей стабильностью, чем структура белка *Photobacterium leiognathi*.

Наибольшую чувствительность к изменению структуры белков проявил метод время-разрешенной флуоресценции.

Работа была поддержана фондом Министерством науки и высшего образования РФ (госзадание № 2020-2022 - FSRZ-2020-0006).

1. A. A. Deeva, E. A. Temlyakova, A. A. Sorokin, E. V. Nemtseva, V. A. Kratasyuk, *Bioinformatics*, 32(20), 3053–3057 (2016)
2. J. K. Inlow, T. O. Baldwin, *Biochemistry*, 41(12), 3906–3915 (2002)

ПСЕВДОФОТОКОНВЕРСИЯ НА ПРИМЕРЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА mKate2 Pseudophotoconversion of the mKate2 fluorescent protein

Елена Протасова¹, Александр Мишин², Константин Лукьянов²,
Евгений Максимов¹, Алексей Богданов²

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

² – Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

*e-mail: 123protasovaelen@gmail.com, тел. +7 981 5516432

Фотоактивные флуоресцентные белки активно используются для микроскопии сверхвысокого разрешения, поэтому поиск новых фотоактивных белков и изучение их свойств чрезвычайно важны. Фотоактивность может проявляться в обратимом переключении между состояниями с различным квантовым выходом флуоресценции, изменении формы спектра или разгорании флуоресценции. Периодически появляются данные о новых фотоактивных флуоресцентных белках, однако часто без описания механизмов фототрансформации.

В данной работе мы изучили «фотоконверсию» красного флуоресцентного белка mKate2. Сообщение о возможной фотоактивности красных флуоресцентных белков из этой группы появилось в 2009 году в работе Кремерса с соавторами на клетках, экспрессирующих белки mKate и Katushka. Авторы этой статьи утверждают, что при интенсивном облучении белок переходит из красной формы в зеленую [1]. Чтобы проверить это предположение мы провели анализ спектральных характеристик mKate2 с помощью флуоресцентной микроскопии, абсорбционной спектроскопии и флуоресцентной спектроскопии с пикосекундным временным разрешением. Полученные нами данные показали, что синие и зеленые спектральные формы mKate2 существуют еще до «фотоактивации». Время жизни флуоресценции коротковолновых форм, как и общая интенсивность флуоресценции увеличивается при фотообесцвечивании красной формы, тогда как спектр поглощения практически не изменяется. Изменение формы спектра поглощения вместе с ростом вклада флуоресценции коротковолновых форм происходит после добавления универсального восстановителя дитионита независимо от облучения.

Мы полагаем, что в клетках могут образовываться несколько спектральных форм белка, и, несмотря на мономерность mKate2, его концентрация в клетке достаточно высока для переноса энергии между отдельными хромофорами. Таким образом, механизм «фотоконверсии» mKate2 аналогичен «позеленению» тетрамерного белка DsRed: в растворе которого изначально присутствует фракция зеленых белков, однако их флуоресценция маскирована резонансным переносом энергии на красные хромофоры; при обесцвечивании последних интенсивность флуоресценции белков с зеленым хромофором увеличивается. Наша работа показывает необходимость исследования фотоактивности флуоресцентных белков на уровне отдельных молекул и их ансамблей.

Работа была поддержана Российским научным фондом (грант № 20-14-00255).

1. Kremers G.-J., Hazelwood K.L., Murphy C.S., Davidson M.W., Piston D.W. Photoconversion in orange and red fluorescent proteins // *Nature Methods*. 2009. № 5 (6). С. 355–358

БИОЛУМИНЕСЦЕНТНАЯ СИСТЕМА МОРСКОЙ ПОЛИХЕТЫ *CHAETOPTERUS VARIOPEDATUS* Bioluminescent system of the marine polychaete *Chaetopterus variopedatus*

Константин Пуртов

ИБФ СО РАН

*e-mail: purtovk@mail.ru, тел. +7 923 2885125

Морская полихета *Chaetopterus variopedatus* – космополит, обитает в умеренных и тропических регионах по всему миру, разные его подвиды встречаются в прибрежных районах России, Японии, Австралии, Бразилии, Европы и США [1]. *C. variopedatus* живет, прячась в построенной самостоятельно U-образной пергаментной трубке, погруженной в грунт. У него сегментированное червеобразное тело с парными конечностями. В ответ на агрессивное воздействие извне *C. variopedatus* выпускает облако светящейся голубым светом (с максимумом на 460 нм) слизи [1]. При этом ярко светятся также пароподии всех сегментов тела червя. Издавна это явление привлекало внимание любопытных наблюдателей, о чем свидетельствуют разнообразные публикации. Многие исследователи на протяжении последних 50–70 лет пытались понять биохимические аспекты процесса свечения *C. variopedatus* [2]. Но их результаты полны противоречий, поэтому до сегодняшнего времени было непонятно, как именно работает биолуминесцентная система этой полихеты.

Недавно нами было показано, что биолуминесцентная система *C. variopedatus* относится к люциферин-люциферазным системам [3].

На данный момент нами выделены субстраты участвующие в биолуминесцентной реакции *C. variopedatus*, расшифрованы их химические структуры и осуществлен их синтез. Кроме того, нами были выделены люциферазы *C. variopedatus* в чистом виде. Был расшифрован транскриптом этого организма. Был проведен масс-спектрометрический анализ пептидов полученных из этих люцифераз трипсинолизом, с определением их последовательности и поиск в транскриптом *C. variopedatus* транскриптов, содержащих расшифрованные пептиды. На основании этих данных были клонированы гены люцифераз *C. variopedatus* и получены штаммы продуценты рекомбинантных люцифераз.

1. Osborn, K. J., G. W. Rouse, S. K. Goffredi and B. H. Robison (2007) Description and relationships of *Chaetopterus pugaporcinus*, an unusual pelagic polychaete (Annelida, Chaetopteridae). *The Biological Bulletin*. 212(1), 40–54
2. Mirza J. D., Migotto Á. E., Yampolsky I. V., Moraes G. V., Tsarkova A. S., Oliveira A. G. (2020) *Chaetopterus variopedatus* Bioluminescence: A Review of Light Emission within a Species Complex. *Photochemistry and photobiology* 96(4), 768–778
3. Purto, K. V., V. N. Petushkov, N. S. Rodionova, V. G. Pakhomova, I. N. Myasnyanko, N. M. Myshkina, A. S. Tsarkova, and J. I. Gitelson (2019) Luciferin-luciferase system of marine polychaete *Chaetopterus variopedatus*. *Dokl. Biochem. Biophys.* 486 (1) 209–212

СЕКЦИЯ 7. МИКРОВОДОРОСЛИ
КАК ПРЕОБРАЗОВАТЕЛИ СОЛНЕЧНОЙ ЭНЕРГИИ
В БИОТОПЛИВА И ЦЕННЫЕ ПРОДУКТЫ

**Поиск фототрофных микроорганизмов,
перспективных для получения биотоплива**
Search for phototrophic microorganisms promising for biofuel production

**Айшат Бозиева^{*}, Мария Синетова¹, Елена Куприянова¹, Сергей Жармухамедов²,
Сулейман Аллахвердиев^{1,2}**

1 – Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35

2 – Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 142290, Московская область, г. Пушкино, ул. Институтская, 2

*e-mail: bozievaayshat@ifr.moscow, тел. +7 928 6908326

Рост населения планеты, а также возрастающая добыча природного сырья указывают на необходимость поиска новых, перспективных, экологически чистых и возобновляемых источников энергии. Интерес к фототрофным микроорганизмам обусловлен их способностью к более быстрому накоплению биомассы в сравнении с традиционными сельскохозяйственными культурами. В этом отношении цианобактерии и микроводоросли привлекают внимание как потенциальные продуценты биотоплива «третьего» поколения. Однако, поиск более перспективных штаммов микроорганизмов по-прежнему остается актуальным. Важными показателями для штаммов потенциальных продуцентов биотоплива являются высокая скорость роста и накопления биомассы, а также высокая фотосинтетическая активность клеток. В связи с этим нами исследованы штаммы цианобактерий *Cyanobacterium* sp. IPPAS B – 1200, *Dolichospermum* sp. IPPAS B – 1213, *Sodalinema gerasimenkoae* IPPAS B – 353 из коллекции цианобактерий и микроводорослей IPPAS ИФР РАН. Штамм *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT-L был взят в качестве контроля. Для каждого из этих штаммов построены кривые роста, рассчитаны показатели относительной скорости роста и времени удвоения биомассы, определен пигментный состав и охарактеризована фотосинтетическая активность клеток, исследовано влияние pH окружающей среды на скорость выделения кислорода. Полученные экспериментальные данные дают основание полагать, что выбранные штаммы цианобактерий могут оказаться перспективными продуцентами биотоплива и требуют дальнейших исследований в этом направлении.

Работа поддержана Российским научным фондом, грант 19-14-00118.

Влияние освещённости на скорость роста и продукцию пигментов и белка полупроточной культуры *PORPHYRIDIUM PURPUREUM* (BORY) ROSS
Porphyridium purpureum (Bory) Ross culture growth and B-phycoerythrin, protein production under different illumination

Андрей Боровков, Ирина Гудвилович

ФГБУН ФИЦ Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН

*e-mail: spirit2000sev@yandex.ru

Одной из фундаментальных проблем при исследовании продукционных процессов фотоавтотрофных микроорганизмов является выявление закономерностей, связывающих скорость и эффективность фотобиосинтеза со световыми условиями и обеспеченностью минеральным субстратом. Изучению влияния условий культивирования на рост биотехнологически перспективной красной микроводоросли *P. purpureum*, а также особенностям накопления в её клетках пигментов посвящено достаточно много исследований, однако их сравнительный анализ представляет собой непростую задачу из-за кардинально отличающихся типов фотобиореакторов, характера освещения и питательных сред. При этом интенсивность света является одним из самых критических факторов, которые влияют на количественный состав пигментов микроводорослей.

Современные данные свидетельствуют о негативном влиянии повышенного уровня облучённости на процессы биосинтеза ФБП в клетках *P. purpureum*, даже при условии достаточного обеспечения элементами минерального питания. Изучение роста полупроточной культуры *P. purpureum*, накопления и продукции белка и пигментов было проведено при поверхностной освещённости 5–200 Вт/м² и удельной скорости протока среды 0,1–0,5 сут⁻¹. Световые условия в эксперименте существенно различались, поэтому была рассчитана удельная освещённость клеток для каждого стационарного состояния.

Таким образом, повышение удельной освещённости в эксперименте от 0,2 до 1 Вт/г на фоне повышения скорости протока среды приводило к росту продуктивности *P. purpureum* по биомассе и уменьшению содержания В-ФЭ в его клетках. В итоге, снижение относительного содержания пигмента не оказывало выраженного влияния на продукцию В-ФЭ, так как оно компенсировалось повышением скорости роста культуры.

Следует отметить, что характер изменения продукционных характеристик *P. purpureum* был неравномерным при различном уровне освещённости клеток. Максимальный рост всех исследованных продукционных характеристик наблюдался при низкой освещённости (от 0,2 до 1 Вт/г), а максимальный выход биомассы *P. purpureum*, пигмента В-ФЭ и белка – при освещённости 1–3 Вт/г на фоне замедления темпов роста и биосинтеза культуры. Повышение удельной освещённости свыше 3 Вт/г приводило к существенному снижению продуктивности порфиридиума как по биомассе, так и по В-ФЭ, и белку. При низкой освещённости клеток микроводоросли *P. purpureum*, незначительно превышающей компенсационный пункт фотосинтеза, наблюдался как рост продуктивности культуры, так и увеличение содержания в ней В-ФЭ, что предопределяет получение высокой продукции пигмент-белковых комплексов. Показано, что изменение продукционных характеристик в культуре *P. purpureum* (по биомассе, белку и В-фикоэритрину (В-ФЭ)) в диапазоне удельной освещённости от 0 до 8 Вт/г имело однонаправленный характер. Максимальный выход биомассы *P. purpureum*, пигмента В-ФЭ и белка наблюдался при освещённости 1,5–3 Вт/г. Таким образом, более низкий уровень поверхностной освещённости является предпочтительным для выращивания *P. purpureum*, а при высоком уровне освещённости клеток наблюдаются процессы, свидетельствующие об угнетении роста культуры и биосинтеза ФБП.

**КАРОТИНОИД-БЕЛКОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ ИЗ ТИЛАКОИДНЫХ
МЕМБРАН ЦИАНОБАКТЕРИИ *ARTHROSPIRA PLATENSIS***
**Carotenoid-protein complexes from thylakoid membranes of cyanobacterium
*Arthrospira platensis***

**Юлия Вечтомова^{1*}, Таисия Телегина¹, Михаил Бирюков², Михаил Нехорошев³,
Руслан Геворгиз³**

1 – Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр

«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

2 – Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова

3 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный
исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»
*e-mail: vechtomova@inbi.ras.ru, тел. +7 926 2903571

Цианобактерии и, в частности *Arthrospira platensis* (спирулина), синтезируют разнообразные каротиноиды, которые находятся в цитоплазматической и наружной мембранах, в тилакоидных мембранах, а также в составе водорастворимых каротиноид-белковых комплексов [1, 2, 3]. В спирулине присутствуют β, β -каротин (35%), зеаксантин (31%), миксоксантофилл (31%) и осциллоксантин (3%) в виде гликозидов, эхиненон (2%), 3-гидрокси-эхиненон (1%), β, β каротин-5,8-эпоксид (2%) и криптоксантин (2%) [4]. Каротиноидный пул цианобактерий подвержен значительным вариациям в зависимости от условий освещения и наличия тех или иных веществ, определяющих жизненные процессы цианобактерий.

В составе комплексов с белками каротиноиды могут выполнять различные функции: структурные, фотопротекторные, антенные. Методом ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы при 220000 g мы выделили из тилакоидных мембран спирулины 5 фракций каротиноид-белковых комплексов и охарактеризовали их методами спектроскопии в ИК, видимой и УФ областях спектра, КД-спектроскопии, электрофореза в ПААГ в присутствии ДДС и высокоэффективной эксклюзионной гель-хроматографии. Особое внимание было уделено каротиноид-белковому комплексу, который выпадал в нерастворимый осадок при ультрацентрифугировании в градиенте сахарозы (20%–50%), поскольку подобный нерастворимый комплекс ранее был получен из сухой биомассы спирулины разработанным нами методом с использованием экстракции смесью Фолча [2]. Методом ВЭЖХ показано, что в составе нерастворимого в воде каротиноид-белкового комплекса, выпадающего в осадок при ультрацентрифугировании в градиенте сахарозы, находятся ксантофиллы: миксоксантофилл и осциллоксантин. Обсуждены предполагаемые функции выделенных каротиноид-белковых комплексов в составе тилакоидных мембран цианобактерии *Arthrospira platensis*.

Работа была поддержана РНФ. (грант № 21-74-20155)

1. Takaichi S., Mochimaru M. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2007, vol. 64, no. 19–20, 2607
2. Телегина Т.А., Геворгиз Р.Г., Нехорошев М.В., Бирюков М.В., Вечтомова Ю.Л., Крицкий М.С. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2018, т. 3, № 4, С. 706–710
3. Телегина Т.А., Бирюков М.В., Терехова И.В., Вечтомова Ю.Л., Крицкий М.С. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2018, т. 54, № 6, С. 594–602
4. Aakermann T., Skulberg O.M., Liaaen-Jensen S. *A Biochemical Systematics and Ecology*, 1992, vol. 20 no. 8, P. 761–769

**ПЛОСКОСТНОЙ ФОТОБИОРЕАКТОР ЗАКРЫТОГО ТИПА ДЛЯ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ ПРАКТИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ**
Flat-panel photobioreactor for microalgae cultivation for practical purposes

**Д. А. Габриелян^{*}, Б. В. Габель, М. А. Синетова, А. К. Габриелян,
А. Г. Маркелова, Д. А. Лось**

ФГБУН Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН

*e-mail: gabrielyanda@ifr.moscow, тел.: +7 910 4271530

Практический интерес к культивированию микроводорослей обусловлен возможностью высокоэффективного преобразования световой энергии в ценные метаболиты, витамины и различные органические соединения, которые находят широкое применение в фармацевтике, медицине, энергетике, сельском хозяйстве и в других сферах деятельности человека [1].

Для промышленного производства биомассы микроводорослей необходимо создание фотобиореакторов, обеспечивающих ведение культивирования в стабильных, оптимизированных технологических режимах с высокой эффективностью использования падающей световой энергии и процессов массообмена [2]. Представленный в докладе фотобиореактор рабочим объемом 17 литров разработан на основе многолетних научных исследований в области альгологии и опыта создания фотобиореакторов в Институте физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН [3]. Модульная конструкция реактора и заложенные технические решения допускают масштабирование и обеспечивают удобство эксплуатации. В докладе представлены результаты экспериментальных запусков культивирования штамма *Chlorella sorokiniana* IPPAS C-1 в плоскостном фотобиореакторе закрытого типа рабочим объемом 17 литров (ФБР П-17) и системой светодиодного освещения. Авторами дано описание конструкции и особенностей работы ФБР П-17. По результатам серии запусков выявлено соответствие между значениями оптической плотности суспензии хлореллы IPPAS C-1, измеренной при $\lambda = 750$ нм, и продуктивностью ее культивирования, выраженной в г сухой массы на литр суспензии; получены зависимости продуктивности культивирования от объемов и условий подачи углекислого газа в суспензию микроводорослей; определены задачи, решение которых необходимо для дальнейшего увеличения продуктивности фотобиореактора.

Часть работ, представленных в докладе, выполнена на базе «Научно-производственного биотехнологического комплекса для проведения работ по изучению, сохранению и практическому применению культивируемых клеток и органов высших растений и микроводорослей» при финансовой поддержке Мегагранта Правительства Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1882).

1. Sinetova, M. A. et al. Assessment of the biotechnological potential of cyanobacterial and microalgal strains from IPPAS culture collection. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2020 V. 56 P. 794–808
2. Zhang, L. et al. Role of bioreactors in microbial biomass and energy conversion // In: Liao Q, Chang JS, Herrmann C, Xia A (eds). *Bioreactors for microbial biomass and energy conversion*: Springer, Singapore. 2018. P. 39–46
3. Цоглин Л.Н., Пронина Н.А. Биотехнологии микроводорослей. – М.: Научный мир, 2012 – 184с

РОЛЬ АВТОФАГИИ В СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТИ И АКТИВАЦИИ БИОСИНТЕЗА АСТАКСАНТИНА У МИКРОВОДОРΟΣЛИ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*
Role of autophagy in resistance to salt stress and in astaxanthin synthesis in the microalga *Haematococcus pluvialis*

Дарья Жарова*, Ольга Болдина, Александра Иванова, Ирина Дроздова, Елена Тютерева, Ольга Войцеховская

Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург
 *e-mail: DZharova@binran.ru; тел. +7 9522335626

Одноклеточная зелёная микроводоросль *Haematococcus pluvialis* является источником промышленного получения пигмента астаксантина, который обладает антиоксидантными свойствами. *Haematococcus pluvialis* в стрессовых условиях накапливает липидные включения, содержащие астаксантин [1]. Автофагия – цитопрокторная программа, свойственная эукариотическим клеткам, которая активируется при ряде стрессов и обеспечивает выживание. Примечательно, что у зелёных микроводорослей автофагия необходима для осуществления биосинтеза триацилглицеролов, а также биогенеза липидных капель [2]. Мы изучали, может ли активация процесса автофагии улучшить выживаемость клеток и выход пигмента в условиях солевого стресса. Автофагию активировали с помощью ингибитора TOR-киназы AZD8055. Культура *Haematococcus pluvialis* выращивалась при оптимальном составе среды [3], люминесцентном освещении, постоянном продувании и температуре +24°C. Для стимуляции накопления астаксантина культура выращивалась на среде с 0.2% NaCl (м/об) и 0.8% NaCl (м/об), с добавлением или в отсутствие акселератора автофагии AZD8055. Автофагосомы визуализировали с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции с антителами к белку ATG8, а также с помощью ТЭМ. В клетках культуры также оценивали содержание ионов калия и натрия, динамику выживаемости клеток (с помощью красителя Эванса синего) и уровень накопления каротиноидов. Нами показано, что усиление автофагии на фоне умеренного солевого стресса (0.2% NaCl) значительно улучшает выживаемость клеток *Haematococcus pluvialis*, однако, при этом снижается накопление каротиноидов. В ходе работы подбирали условия для повышения суммарного содержания каротиноидов. В докладе будут представлены результаты данного исследования.

Исследование поддержано РНФ (грант №18-16-00074).

1. Ota S., Morita A., Ohnuki S. et al. Carotenoid dynamics and lipid droplet containing astaxanthin in response to light in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Sci Rep* 8, 5617 (2018)
2. Couso I., Pérez-Pérez M.E., Martínez-Force E. et al. Autophagic flux is required for the synthesis of triacylglycerols and ribosomal protein turnover in *Chlamydomonas*. *J. Exp. Bot.* 2017, 69, 1355–1367
3. Fábregas J., Domínguez A., Regueiro M. et al. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 53, 530–535 (2000)

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ПРИНЦИПЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ ФОТОБИОСИНТЕЗА МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ В КУЛЬТУРЕ
Basic principles of modeling microalgae's culture photobiosynthesis

Александр Лелеков

ФГБУН ФИЦ "Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН"
 *e-mail: a.lelekov@yandex.ru, тел. +7 978 7891071

Низшие фотоавтотрофные организмы являются одними из древнейших обитателей Земли. В современной систематике к категории низших фотоавтотрофов относят одноклеточные водоросли и цианопрокариоты, которые способны к кислородному фотосинтезу, характеризуются пространственным и временным разделением фотохимических и ферментативных процессов. Широкое распространение культуры микроводорослей получили еще в начале двадцатого века при исследовании фотосинтеза, при этом многие открытия в этой области сделаны именно на микроводорослях. Основным достоинством использования культур является возможность получения воспроизводимых результатов.

Одним из наиболее эффективных методов исследования роста и биосинтеза культур микроводорослей является математическое моделирование. Устоявшаяся парадигма моделирования подразумевает использование моделей Аррениуса для температурных зависимостей, Михаэлиса-Ментен (Моно) или Друпа – для субстратзависимого роста, Бугера-Ламберта-Бера – для поглощения света и пр. Однако многочисленные данные свидетельствуют об отклонениях экспериментальных кривых от указанных моделей, что привело ко множеству работ по их уточнению и модификации. Поэтому возникает необходимость в разработке новых теоретических подходов, которые позволят объединить знания о росте микроводорослей на молекулярном, клеточном и популяционном уровне в единое целое. На сегодняшний день, ввиду появления новых знаний о фотобiosинтезе микроводорослей, структуре их популяций, намечается смена парадигм [1], которая ещё не нашла достаточного подтверждения теоретических и экспериментальных исследованиях. Однако для культур микроводорослей в строго контролируемых условиях, можно сформулировать фундаментальные положения, на которых должно строиться моделирование роста: 1. Зависимость скорости фотобiosинтеза от приведённой плотности потока энергетического или пластического субстрата описывается линейными сплайнами; 2. При моделировании роста культуры биомассу микроводорослей необходимо разделить на две макромолекулярные составляющие: резервная и структурная компонента; 3. Существует ключевой ферментный комплекс, на котором происходит сопряжение энергообменных реакций фотобiosинтеза. Максимальные скорости синтеза биомассы в целом или макромолекулярной составляющей определяются количеством (концентрацией), активностью и структурной организацией комплекса; 4. В области лимитирования скорость образования резервной части биомассы прямопропорциональна приведённой плотности потока внешнего субстрата, в то время как продукция структуры определяется внутриклеточным потоком резервов на ключевой ферментный комплекс; 5. Внутриклеточные потоки могут быть выражены через соотношение резервной и структурной частей биомассы, которое является ключевым измеряемым параметром, определяющим скорость образования структуры. Перечисленные принципы моделирования фотобiosинтеза, позволяют заложить теоретические основы роста микроводорослей в культуре, определить видоспецифические коэффициенты моделей, которые имеют чёткий биологический смысл и не зависят от внешних условий.

Работа выполнена в рамках темы госзадания ФИЦ ИнБЮМ № 121030300149-0.

1. Камнев А.Н., Розенберг Г.С., Силкин В.А. Зачем нужен научный журнал нового формата, освещающий вопросы гидроэкологии // Экология гидросферы. 2018. №1 (2). url: <http://hydrosphere-ecology.ru/98>.

**СРАВНЕНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ ПОДХОДОВ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ
МОДИФИКАЦИИ *RHODOBACTER CAPSULATUS***
**Comparison and optimization of genetic modification approaches of the
*Rhodobacter capsulatus***

Екатерина Майорова^{1,2*}, Екатерина Петушкова¹

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

2 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пущинский государственный естественно-научный институт», г. Пущино, Московская область, 142290, Россия

*e-mail: ekaterina.majorova.97@mail.ru, тел. +7(496)-773-27-91

Пурпурная несерная бактерия (ПНСБ) *Rba. capsulatus* благодаря уникальным физиологическим свойствам является перспективным продуцентом для получения соединений, синтезируемых как природными штаммами, так и генетически модифицированными, в том числе за счет гетерологичной экспрессии чужеродных генов. Для переноса генетического материала в клетку бактерии используют конъюгацию, трансдукцию и трансформацию (химическую и электропорацией).

Химическая трансформация имеет ряд преимуществ, заключающихся в простоте, доступности и экономичности подхода; возможности использования неочищенной лигазной смеси, в отличие от электропорации, требующей применения исключительно очищенной ДНК и т.д.

Данный процесс был осуществлен на ПНСБ в 1982 году Fornari и Kaplan [1]. Авторы трансформировали несколько штаммов *Rba. sphaeroides* четырьмя разными небольшими плазмидами широкого круга хозяев. Для приобретения клетками компетентности бактерий подвергали воздействию 200 мМ CaCl₂, Трис-НСl и полиэтиленгликоля (для дополнительного воздействия на внешнюю и внутреннюю мембрану, соответственно). После внесения ДНК клетки оставляли во льду на несколько минут, затем подвергали тепловому шоку при 35°C в течение 2 минут. На эффективность трансформации значительное влияние оказали структура, размер и концентрация плазмидной ДНК.

В 2019 году был разработан новый подход химической трансформации для морских ПНСБ [2]. Дополнительным фактором для придания клеткам компетентности, помимо обработки 50 мМ CaCl₂ и теплового шока (в течение 1 мин при 42°C), был холодовой стресс (инкубация во льду перед внесением ДНК и после этого длилась более 3 часов) [2].

В данной работе исследовано, факторы какого из описанных подходов обеспечили большую частоту трансформации плазмидной ДНК в клетки *Rba. capsulatus*. Обсуждается эффективность метода химической трансформации в сравнении с другими подходами.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-14-00255.

1. Fornari, C. S. Genetic transformation of *Rhodospseudomonas sphaeroides* by plasmid DNA / C. S. Fornari, S. Kaplan // *Journal of bacteriology*. – 1982. – Vol. 150, № 1. – P.89–97
2. Higuchi-Takeuchi, M. Method for the facile transformation of marine purple photosynthetic bacteria using chemically competent cells / M. Higuchi-Takeuchi, K. Morisaki, K. Numata // *Microbiologyopen*. – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 1–9

**СОДЕРЖАНИЕ ХЛОРОФИЛЛА В БИОМАССЕ МОРСКИХ
МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ПРИ СВЕТОВОМ ЛИМИТИРОВАНИИ**
Chlorophyll content in the marine microalgae biomass under light limitation

Татьяна Новикова

ФГБУН ФИЦ Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН

*e-mail: nowtanj@yandex.ru

При адаптации микроводорослей к различной облучённости происходят изменения пигментного состава клеток. Так, для различных систематических групп микроводорослей с ростом облучённости отмечено уменьшение количества хлорофилла *a* и других пигментов. Кроме того, в течение светового периода в клетках микроводорослей происходит синтез и накопление запасных (резервных) углеводов и липидов, которые расходуются в темновой период, в том числе на синтез белков.

Качественные модели зависимости относительного содержания хлорофилла *a* от облучённости базируются на общепринятых представлениях о фотодеструкции пигментов. Несмотря на широкое распространение данного подхода, в литературе можно встретить работы, в которых экспериментально деструкция пигментов не была подтверждена. Так, доля хлорофиллида и других продуктов распада не превышает 2% клеточного содержания хлорофилла *a* при любых облучёностях. Представляется актуальным разработка новых подходов, которые, не отвергая существующих представлений, позволили бы предложить новые базовые принципы моделирования влияния света на фотобиосинтез культур микроводорослей.

Предлагаемый нами подход базируется на общепринятой схеме разделения процессов фотобиосинтеза микроводорослей на световую и темновую стадии, а также разделении продуктов этих стадий на резервные и структурные составляющие. Для условий светолимитирования в культурах невысокой плотности соотношение резервных и структурных форм биомассы определяется внешней облучённостью. В основе лежит система уравнений, которые описывают зависимости скоростей изменения структурной и резервной части биомассы от внешних и внутренних потоков лимитирующего субстрата. В качестве внешнего потока рассматривается поток световой энергии, внутреннего – поток резервных компонентов биомассы на ключевой ферментный комплекс, на котором происходит синтез структурной части.

Дополним базовую систему уравнений излагаемым, учитывающим то, что часть структурной биомассы может превращаться в резервную. Этот процесс осуществляется в ходе эндогенного катаболизма («темнового дыхания») микроводорослей. Расход части структурной биомассы обеспечивает процессы фотобиосинтеза дополнительным количеством энергии в форме макроэргов, а также «углеродными скелетами» – интермедиатами цикла Кребса.

Предложенный модельный подход, основанный на общих представлениях о процессах фотобиосинтеза культур микроводорослей, позволяет объяснить снижение относительного содержания хлорофилла с ростом внешней облучённости. Отметим, что при составлении первичной системы дифференциальных уравнений не учитывалось фотодеструктивное окисление пигмента, а хлорофилл отнесён к структурным составляющим биомассы, при этом его доля в структуре остается неизменной. Получено модифицированное уравнение зависимости относительного содержания хлорофилла *a* от интенсивности действующего света для культур невысокой плотности. Модель с высокой точностью описывает результаты экспериментальных данных для *Tetraselmis viridis* и *Arthrospira platensis*. Рассчитанные параметры модели необходимо рассматривать как оценочные, значения которых могут уточняться при верификации на большом объёме экспериментальных данных. Тем не менее, значения коэффициентов для двух видов микроводорослей близки, что позволяет судить об универсальности предлагаемого подхода.

**АККЛИМАЦИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА МИКРОВОДОРОСЛИ
LOBOSPHAERA INCISA IPPAS C-2047 К НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ
Acclimation of the photosynthetic apparatus of the microalgae
Lobosphaera incisa IPPAS C-2047 to low temperature**

**В. В. Птушенко^{1,2*}, Г. Н. Бондаренко³, Е. Н. Виноградова⁴, Е. С. Глаголева⁴,
О. В. Карпова⁴, О. С. Птушенко⁴, А. Е. Соловченко⁴, Б. В. Трубицин⁵,
О. Б. Чивкунова⁴, К. А. Шибзухова⁴**

1 – НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (МГУ)
2 – Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН
3 – Химический факультет МГУ
4 – Биологический факультет МГУ; 5 – Физический факультет МГУ
* e-mail: ptush@belozersky.msu.ru, тел. +7 495 9391454

В фотосинтетическом аппарате (ФСА) растений при неоптимальных условиях нарушается баланс между поглощением света и его использованием в ходе фотохимических, электрон-транспортных и биохимических реакций фотосинтеза. Это вызывает необходимость защиты ФСА от избыточного освещения и регуляции различных фотосинтетических реакций при изменении внешних условий. При этом растение использует как стресс-специфические, так и универсальные механизмы защиты и регуляции работы ФСА. Активность индуцируемых защитных и регуляторных механизмов определяется также экологическими особенностями организма. В этой связи большой интерес для исследований индукции защитных и регуляторных механизмов ФСА представляет зеленая микроводоросль *Lobosphaera incisa* (ранее *Parietochloris incisa*). Представители этого вида были выделены как из образцов почвы регионов умеренного и холодного климата [1], так и с поверхности снежников в горных районах [2], что указывает на вероятную устойчивость этого вида к пониженным температурам.

Наши исследования показали, что в суспензионной культуре клетки микроводоросли *L. incisa* IPPAS C-2047, способны сохранять фотоассимиляцию при охлаждении вплоть до околонулевых температур. При этом, однако, квантовая эффективность фотосистемы 2, Φ_{PSII} , существенно снижается, причём основное снижение происходит уже в течение первых трёх-пяти дней с момента начала культивации культуры при низкой температуре. Параллельно происходит усиление тепловой диссипации энергии поглощаемого света. Среди исследованных нами механизмов, обеспечивающих эту акклимацию, только степень дезоксидации пула ксантофиллов возрастает заметным образом в течение первой фазы акклимации (в первые несколько дней). Уменьшение размеров фотосинтетической антенны и общее накопление каротиноидов, которые также имеют защитную функцию, происходит в течение более длительного времени. При акклимации к низкой температуре развивается также специфическая реакция – накопление полиненасыщенных жирных кислот в составе липидов клетки. Эта реакция также развивается в течение всего времени акклимации. Характерно, что даже через 10 дней после начала низкотемпературной акклимации наблюдается увеличение экспрессии гена одной из десатураз ($\Delta 5$ -десатураза), в то время как экспрессия гена виолаксантиндеэпоксидазы (VDE) в это время не наблюдается. Это согласуется с высказанным ранее предположением о регуляции активности VDE, в которой участвует продукт $\Delta 5$ -десатуразы, арахидоновая кислота [3].

Работа была поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 19-04-00509)

1. Shibzukhova K. et al. (2017) *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 72(3), 137–141
2. Watanabe S. et al. (1996) *Phycological Research*, 44(2), 107–108
3. Zorin B. et al. (2017) *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(9), 853–868

**ПРЕОБРАЗОВАНИЕ ЭНЕРГИИ СВЕТА В ВОДОРОД ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИМИ
МИКРООРГАНИЗМАМИ И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОЦЕССА
Conversion of light energy into hydrogen by photosynthetic microorganisms and
evaluation of the process efficiency**

Анастасия Романова*, Татьяна Лауринавичене, Анатолий Цыганков

Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, Московская область, 142290
*e-mail: gavrisheva.ast@gmail.com, тел. +7(909)904-15-93

Использование ископаемого топлива коррелирует с повышением уровня концентрации углекислого газа в атмосфере. Чтобы избежать этой проблемы, следует внедрять в практику новые источники энергии. Фотобиологическое производство водорода (H_2) считается одной из самых многообещающих технологий в альтернативной энергетике [1].

Целью наших исследований было сравнение разных подходов к биологическому преобразованию энергии света в водород с точки зрения доступности и эффективности.

Была оценена фотосинтетическая активность и особенности выделения H_2 у родительского штамма цианобактерии *Anabaena* sp. 7120, ΔNup (не синтезирующих водород-поглощающую гидрогеназу) и мутантов $dc-Q193S$ и $dc-R284N$, с мутациями вблизи активного центра нитрогеназы. Нитрогеназная активность по выделению водорода, а также фотосинтетическая активность мутантов была ниже, чем у родительского штамма ΔNup . Мутант $dc-Q193S$, в отличие от родительского штамма ΔNup , продемонстрировал более низкий температурный оптимум для выделения H_2 . При этом выделение H_2 у мутантов мало отличалось от родительского штамма по энергии активации, по константам насыщения светом и по ингибированию ацетиленом. Однако в отличие от родительского штамма выделение H_2 у них не ингибировалось молекулярным азотом. Возможность использования азота или воздуха вместо аргона при получении водорода перспективна с практической точки зрения, но пониженная активность и повышенная хрупкость филаментов у изученных мутантов ограничивает возможности их практического использования.

Изучена возможность выделения H_2 цианобактерией *Anabaena* sp. 7120 ΔNup и эффективность преобразования энергии во внелабораторных природных условиях в Подмоскowie с использованием простейших фотобиореакторов. Два эксперимента были выполнены в июле и августе при средней дневной температуре 21,7 и 20,6°C, средней дневной интенсивности света 290 и 340 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$, соответственно. Максимальная скорость продуцирования H_2 составляла 20,6 мл день⁻¹ л⁻¹ культуры с накоплением 33,2 мл/л в течение 5 дней и конечным содержанием H_2 1,1%. Полученные активности были ниже по сравнению с лабораторными данными. Это могло быть связано с неоптимальными погодными условиями и использованием простого неконтролируемого биореактора. Однако результаты доказывают, что выделение H_2 цианобактериями возможно и на открытом воздухе в пластиковых пакетах, самых дешевых фотобиореакторах.

Воспроизведена трехстадийная интегрированная система получения водорода на основе биомассы микроводорослей с использованием хемо- и фототрофных бактерий и оценена эффективность преобразования энергии на каждом этапе. Общая эффективность преобразования энергии составила 0,55%. Очевидно, что эта схема неэффективна для биоконверсии световой энергии из-за множества промежуточных этапов, даже если бы на каждом этапе были достигнуты лучшие из опубликованных данных.

Работа была поддержана фондом РФФИ (№15-54-50032), РФФИ (№19-14-00255)

1. Sakurai, H., Masukawa, H., Kitashima, M., Inoue, K.: Photobiological hydrogen production: bioenergetics and challenges for its practical application. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* 17, 1–25 (2013)

**ВЛИЯНИЕ МИНЕРАЛЬНОГО ГОЛОДАНИЯ НА РАСПРЕДЕЛЕНИЕ УГЛЕРОДА
МЕЖДУ КРАХМАЛОМ И ТРИГЛИЦЕРИНАМИ У ЗЕЛЕННЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ**
Effect of mineral starvation on carbon partitioning between starch and
triacylglycerols in green microalgae

Лидия Бобровникова^{1,2}, Александр Стариков¹, Давид Габриелян¹,
Мария Синетова^{1*}

1 – Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

2 – Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: maria.sinetova@mail.ru, тел. +7 985 4787262

Была исследована динамика накопления крахмала и триацилглицеринов (ТАГ) у трех штаммов зеленых микроводорослей при росте в периодической культуре на полной среде и в условиях голодания по различным элементам (N, P, Mg, S, Fe). Объекты исследования: *Neochlorella semenkoi* IPPAS C-1210 (Trebouxiophyceae); *Nannochloris* sp. (Trebouxiophyceae) IPPAS C-1509; *Coelastrella* sp. IPPAS H-626 (Chlorophyceae).

Содержание ТАГ и крахмала оценивали микроскопически: ТАГ окрашивали липофильным флуоресцентным красителем BODIPY, крахмал – раствором Люголя. Содержание крахмала также оценивали фенол-сернокислым методом, содержание суммарных липидов оценивали по массе их жирных кислот (ЖК).

Исключение любого из пяти элементов (N, P, Mg, S, Fe) приводило в разной степени к замедлению роста у всех исследуемых штаммов. Исключение из среды соединений S привело к гибели культуру штамма IPPAS C-1210 на 6 сутки культивирования, во всех остальных случаях культуры оставались жизнеспособными.

В результате исследования была подтверждена роль азотного голодания как универсального индуктора накопления ТАГ для всех трех штаммов, фосфорное голодание также индуцировало накопление ТАГ, но в меньшей степени, чем азотное. Появление липидных капель наблюдалось уже в 1 сутки голодания по N и P, однако значительных размеров они достигали на 2–3 сутки. Все исследованные типы голодания в 1–2 сутки индуцировали накопление крахмала, однако в дальнейшем в большинстве вариантов голодания его содержание уменьшалось. В случае голодания по N и P это свидетельствовало о переключении на синтез ТАГ. В вариантах голодания по Mg у штаммов IPPAS C-1210 и C-1509, а также у части клеток штамма IPPAS H-626 накопление крахмала продолжалось. Штаммы отличались также по основному запасному продукту в стационарной фазе: штаммы IPPAS C-1210 и IPPAS C-1509 накапливали преимущественно липиды, тогда как штамм IPPAS H-626 – преимущественно крахмал.

Анализ ЖК состава суммарных липидов показал, что липиды всех трех исследуемых штаммов содержат основные ЖК, характерные для зеленых водорослей: пальмитиновую, стеариновую, олеиновую, линолевую и α -линоленовую. Все типы голодания, кроме голодания по Fe, вызвали существенные изменения в ЖК составе суммарных липидов. Хотя направленность изменений в содержании ЖК у исследуемых штаммов отличалась, можно выделить следующие закономерности: исключение из среды соединений магния приводило к увеличению доли пальмитиновой кислоты; исключение из среды соединений азота приводило к увеличению содержания олеиновой кислоты; голодание по Mg, N, P и S вызывало уменьшение содержания линолевой кислоты, при этом содержание α -линоленовой кислоты изменялось в разном направлении; повышенное содержание олеиновой кислоты коррелировало с высоким содержанием ТАГ.

Работа была поддержана Российским научным фондом (грант № 20-14-00280).

**ВЗАИМОСВЯЗЬ ЛИПИДНОГО МЕТАБОЛИЗМА С
ФОТОПРОТЕКТОРНЫМИ ФУНКЦИЯМИ У МИКРОВОДОРОСЛЕЙ**
Interplay between lipids metabolism and the functioning of photoprotective
mechanisms in microalgae

Alexei Solovchenko^{1*}, Elena Lobakova¹, Svetlana Vasilieva¹, Alexandr Lukyanov¹,
Inna Khozin-Goldberg²

1 – Department of Bioengineering, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow 119234 Russia

2 – Microalgal Biotechnology Laboratory, The French Associates Institute for Agriculture and Biotechnology of Drylands, The J. Blaustein Institutes for Desert Research, Ben-Gurion University, Sde Boqer 849900 Israel

*e-mail: solovchenko@mail.bio.msu.ru, тел. +7 495 9392587

Phototrophic cells have acquired a wide range of photoprotective mechanisms in the process of evolution preventing over-capture of light energy and eliminating its consequences. Insight into these mechanisms is crucial both for the understanding of stress resilience of microalgae, and for their industrial cultivation. The tolerance to high light, especially in combination with other adverse factors, depends largely on the flexibility of regulation, the "performance" of lipid biosynthesis and its coordination e.g. with the biosynthesis of photoprotective carotenoids.

Storage or reserve lipids represent an important depot for excess energy and photoassimilates (organic carbon) in microalgal cells. Quantitative micromorphometric data, illustrating a direct relationship between the increase in size and number of cytoplasmic lipid globules (oleosomes) and other manifestations of acclimation to excess light and (or) deficiency of mineral nutrients (nitrogen and phosphorus) are presented.

Special attention is paid to the relationship between the fatty acid profile of membrane lipids, the biophysical properties of membranes and the functioning of photoprotective mechanisms based on thermal dissipation (non-photochemical quenching) of absorbed light energy. The importance of regulation of fatty acid unsaturation in the membrane glycolipids and homeoviscous adaptation for "fine-tuning" of the violaxanthin cycle is emphasized. The role of the "lipid shield" in the functioning of xanthophyll deepoxidases under stress conditions are summarized using the chlorophyte *Lobosphaera incisa* as an illustrious example.

Further, the interrelation of lipid biosynthesis (mainly neutral triacylglycerides) and photoprotective (secondary) carotenoids on different models, from unicellular algae to higher plants, is revealed. Secondary carotenogenesis in microalgae is considered as an example of a photoprotective mechanism, the induction and functioning of which are closely related to the accumulation of neutral lipids in cytoplasmic oleosomes.

We generalize on our experimental data [1-3] accumulated to date on the importance of lipid metabolism for the functioning of photoprotective mechanisms in different groups of phototrophic organisms. The universality of the interrelations of stress tolerance and lipid biosynthesis in microalgae is underlined. The features of structural and functional organization and subcellular localization of these mechanisms in microalgae with different strategies of survival in adverse conditions are highlighted.

Работа была поддержана РФФИ (грант №21-74-20004)

1. Solovchenko A. et al 2019 *Algal Res.* DOI 10.1016/j.algal.2019.101651

2. Kugler A. et al. 2019 *Plant Cell Physiol.* DOI 10.1093/pcp/pcz013

3. Zorin et al. 2017 *BBA – Mol. Cell Biol. Lipids* DOI 10.1016/j.bbalip.2017.04.008

РЕКОНСТРУКЦИЯ HYDSL ГИДРОГЕНАЗЫ *Thiocapsa bogorovii* BBS ПОСЛЕ ИНГИБИРОВАНИЯ ЦИАНИДОМ

**Александр Стародубов, Николай Зорин, Анна Хуснутдинова,
Махмадюсуф Хасимов, Анатолий Цыганков**

ИФПБ РАН, обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Институтская, 2,
г. Пушкино, Московская область, 142290, Россия
*e-mail: alexkex3@gmail.com, тел. 8(4967)732791.

При добыче и переработке нефти образуется около 48% углеводородов и 44% оксида углерода. Данные вещества являются загрязняющими веществами, также количество ископаемого топлива нашей планеты ограничено. В связи с этим, возникает необходимость разработки альтернативных методов получения энергии. С этой точки зрения, перспективным видом топлива является молекулярный водород. Некоторые биологические системы способны выделять водород. Полученный водород может быть преобразован в электрический ток отдельными ферментными системами, которые осуществляют перенос электронов на электрод при поглощении/выделении водорода. HydSL-гидрогеназа пурпурной серной бактерии *Thiocapsa bogorovii* является перспективным ферментом для создания водородных электродов как в качестве топливных элементов без использования благородных металлов, кроме того, изучение воздействия тяжелых металлов на гидрогеназу актуально в свете имеющихся перспектив для разработки на основе гидрогеназ средств для детоксикации, очистки и ремедиации сточных вод промышленных предприятий, загрязненных тяжёлыми металлами и органическими веществами.

Гидрогеназа является ключевым ферментом метаболизма водорода и катализирует обратимую активацию молекулярного водорода. Исследование гидрогеназ возможно и с использованием специфических ингибиторов, потенциально взаимодействующие с FeS кластерами, имеющимися в структуре гидрогеназ. Известно, что при длительном инкубировании гидрогеназы с KCN происходит разрушение железосерных кластеров, из-за чего активность фермента в реакции поглощения водорода исчезает, в тоже время каталитический центр после обработки цианидом остается целым. Поэтому большой интерес представляет возможность реконструкции фермента.

Наши эксперименты показали, что при инкубации гидрогеназы, обработанной цианидом, в присутствии бета-меркаптоэтанола, трехвалентного железа и сульфида натрия активность гидрогеназы в реакции окисления водорода в присутствии метилвиологена восстанавливалась. Процесс реконструкции активности зависел от времени и достигал максимального значения (~60%) в течение 30 минут при комнатной температуре. При этом в спектре поглощения гидрогеназы появлялась полоса поглощения при 420 нм, которая присутствует в нативной гидрогеназе и исчезает после обработки цианидом, что свидетельствует о реконструкции железосерных кластеров.

Таким образом показана возможность реконструкции FeS кластеров из *Thiocapsa bogorovii* BBS.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-14-00255.

РОЛЬ С-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА МАЛОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ HYDSL-ГИДРОГЕНАЗЫ ПУРПУРНОЙ СЕРНОЙ БАКТЕРИИ *Thiocapsa bogorovii* В ЛОКАЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТА И ЕГО ВЗАИМОСВЯЗИ С ВОССТАНОВЛЕНИЕМ СЕРЫ Role of the C-terminal fragment of the small subunit of HydSL hydrogenase of purple sulfur bacterium *Thiocapsa bogorovii* in enzyme localization and its relationship to sulfur reduction

**М. Х. Хасимов*, Е. П. Петушкова, А. Н. Хуснутдинова, А. А. Цыганков,
А. А. Стародубов**

Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук –
обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, г. Пушкино, Россия
* e-mail: hasimov94@mail.ru, тел. +7 496 7732791

Все более актуальным становится внедрение в практику использования возобновляемых источников энергии. Водород является чистым энергоносителем, поскольку он может быть получен из воды и биологическим путем. Продуктом его сгорания является вода. Преобразование химической энергии водорода в электричество осуществимо посредством топливных элементов на основе платины, использование которой делает процесс дорогостоящим и нерентабельным. Альтернативой является фермент гидрогеназа, активирующий молекулярный водород при обычных температурах и давлении со скоростью, в ряде случаев превышающих платиновые катализаторы. Однако для создания гидрогеназы, активно работающей в топливных элементах, необходимо изучение ее взаимодействия с природным донором/акцептором электронов.

HydSL-гидрогеназа пурпурной серной бактерии *T. bogorovii* BBS (прежнее название *T. roseopresicina*) отличается от других гидрогеназ способностью участвовать наряду с другими переносчиками электронов в восстановлении элементарной серы до сероводорода с поглощением водорода. Фермент относится к мембран-ассоциированным белкам. Механизм связывания фермента с клеточной мембраной не изучен, но предполагается, что в нем задействованы белки Isp-1 и Isp-2, гены которых расположены в гидрогеназном опероне между *hydS* и *hydL* генами.

Роль С-концевого фрагмента в локализации HydSL-гидрогеназы и возможности взаимодействия с природными переносчиками электронов изучали с использованием родительского и мутантных штаммов с модификациями в структурном гене *hydS* малой субъединицы гидрогеназы. В одном из них С-концевой фрагмент *hydS* был дополнен шестью гистидиновыми остатками, в другом вместо 54 аминокислот с С-конца *hydS* были встроены шесть гистидиновых остатков.

В ходе проведенных экспериментов, было показано, что генетические модификации не оказали влияния на скорость роста культур исследуемых штаммов, а выделенные мутантные гидрогеназы имеют практически те же характеристики, что и природный фермент, но стали менее стабильны. Продемонстрировано, что ионная сила раствора играет более важную роль в отрыве гидрогеназы от мембраны, чем способ разрушения клеток. Модификация С-концевой последовательности малой субъединицы HydSL-гидрогеназы путем встраивания шести гистидиновых остатков не приводила к изменению локализации гидрогеназы, тогда как удаление 54 аминокислот приводила к тому, что большая часть гидрогеназной активности обнаруживалась в растворимой фракции. При этом, удаление 54 аминокислот приводило к значительному снижению активности целых клеток в реакции образования сероводорода из серы в присутствии водорода. Таким образом, С-концевая последовательность играет важную роль в прикреплении HydSL-гидрогеназы к мембране (через мембран-связанные акцепторы электронов) и в переносе электронов от фермента к переносчикам электронов на сероводород.

Работа поддержана РФФИ (грант № 19-14-00255).

РЕАКЦИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ НА НЕДОСТАТОК МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ ПРИ АНОКСИИ

А. А. Цыганков, В. И. Гречаник

ИФПБ РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, г. Пущино, Московская обл., Институтская, 2
*e-mail: ttt-00@mail.ru

Совместное действие таких стрессовых факторов как недостаток минерального питания и аноксии хорошо изучено на фотогетеротрофных культурах *Chlamydomonas reinhardtii*. Показано, что при недостатке серы, азота или фосфора культуры последовательно проходят несколько стадий адаптации. Начиная со стадии поглощения кислорода активность фотосистем II (ФСII) снижается, причем с наибольшей скоростью это происходит при недостатке серы. Когда скорость фотосинтеза становится ниже скорости дыхания, содержание кислорода в среде становится равным нулю, после чего начинается выделение водорода. Существует несколько предположений, почему происходит падение активности ФСII у фотогетеротрофных культур. В ранних наблюдениях было отмечено, что содержание D1 белка резко снижается, и это считалось основной причиной падения активности ФСII. Отмечено также, что в момент наступления анаэробноза пул пластохинонов переходит в перевосстановленное состояние, что приводит к повышению количества «закрытых» реакционных центров. В других наблюдениях обнаружено, что в анаэробных условиях происходит резкое возрастание аскорбата внутри клеток. Это приводит к разобщению водоокисляющего комплекса и ФСII, что в итоге завершается деградацией ФСII. Эти данные подтверждаются изучением JIP тестов.

Важным отличием фотоавтотрофных и фотогетеротрофных культур является повышенная скорость фотосинтеза и меньшая скорость дыхания. Фотоавтотрофные культуры при недостатке серы способны к выделению водорода, хотя для этого требуется использование специального светового режима (высокая интенсивность света в кислородвыделяющей стадии и низкая в фазе поглощения кислорода). Анализа ФСII с использованием JIP теста у этих культур, а также у культур, адаптирующихся к недостатку азота, в литературе не встречается.

В данной работе приводятся примеры, что фотоавтотрофные культуры могут переходить или не переходить в анаэробноз при недостатке серы или азота, могут проявлять высокую скорость нарастания флуоресценции в точке J, а могут и не проявлять такой особенности. В момент наступления анаэробноза возможно перевосстановление пула пластохинонов (проявляется по скачкообразному падению эффективности ФСII), хотя такое явление наблюдается не всегда. Таким образом, фотоавтотрофные культуры, голодающие по сере или азоту, могут проявлять разные механизмы отклика на недостаток питания: отсутствие падения активности ФСII; падение активности ФСII за счет перевосстановления пула пластохинонов или за счет разобщения водоокисляющего комплекса и ФСII. Высказывается предположение, что реакция фотоавтотрофных культур вариабельна и зависит от внешних факторов. Среди них наиболее важными являются интенсивность света, к которой адаптированы культуры; интенсивность света при адаптации к недостатку элемента питания; разница скоростей фотосинтеза и дыхания в момент наступления анаэробноза. Обсуждаются предположительные эксперименты, которые позволят выявить наиболее важные факторы внешней среды, определяющие вид отклика культур на недостаток элементов питания.

Работа поддержана грантом РФФИ №19-14-00255.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ШИРОКОЙ ЛИНЕЙКИ БИОТОПЛИВ ИЗ БИОМАССЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ Experimental production a wide range of biofuels from microalgae biomass

Надежда Чернова^{1*}, Софья Киселева¹, Михаил Власкин²

1 – НИЛ ВИЭ географического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова
2 – Объединенный институт высоких температур РАН
*e-mail: chernova_nadegda@mail.ru

Поиск альтернатив углеводородному топливу остается актуальной задачей в мировом научном сообществе. Микроводоросли (МКВ) как сырье для производства биотоплива – многообещающий объект исследований. Изъятие культивируемой биомассы МКВ для нужд энергетики не нарушает естественную консервацию органического вещества в биосфере и в этом контексте плантации МКВ служат эффективным краткосрочным стоком антропогенного CO₂, конвертируя его в энергию высокой плотности. Поэтому водородные технологии рассматриваются среди существующих стратегий долгосрочного улавливания и хранения CO₂ (CCS).

Актуальным является скрининг новых перспективных штаммов водорослевой биомассы в качестве нетрадиционного возобновляемого ресурса, разработка эффективных технологий её конверсии в удобные виды биотоплива (биодизель, биоэтанол, биобутанол, бионефть и др.), а также комплексного использования с целью удешевления производства. Экономически эффективное и конкурентоспособное промышленное выращивание МКВ остается актуальной проблемой на протяжении многих лет.

В НИЛ ВИЭ МГУ имени М. В. Ломоносова накоплен значительный опыт крупномасштабного культивирования МКВ (артроспира/спирулина, хлорелла) для получения биометана анаэробным сбраживанием в метантенках и удешевление процесса за счет попутного производства пищевых и кормовых биодобавок. Проведены многолетние эксперименты по выращиванию спирулины в открытых культиваторах в 1988–2008 гг.: лабораторные установки объемом 500 и 1000 м³; натурные эксперименты в Крыму (наземное и морское базирование), в тепличных комплексах (Подмосковье, Поволжье, Приднестровье, Сочи, Украина, Эстония общей площадью более 1.5 га; опытные разработки по применению артроспиры в качестве пищевых и кормовых биологически активных добавок; получены патенты на способы приготовления премикса для птицы, пищевую добавку с гиалуроновой кислотой, на штаммы-продуценты белковой и липидосодержащей биомассы).

С 2008 г. в НИЛ ВИЭ проводится изучение биомассы МКВ в качестве сырья для производства биотоплива 3-го поколения:

- выделены из природной среды МКВ-продуценты липидов на основе окрашивания суданами и флуоресцентным красителем Нильским красным; изучалось влияние основных видов стрессоров на индукцию липидов в клетках МКВ (голодание по азоту/фосфору, повышенная освещенность до 500 μE/ (m² × sec), разные концентрации CO₂ и др.);
- апробированы технологии получения из выращенной биомассы двенадцати вновь выделенных штаммов МКВ биодизеля, биоэтанола, биобутанола, биоводорода, биогаза/биометана (совместно со специалистами химического факультета МГУ); бионефти, сингаза и биоугля технологиями медленного пиролиза и гидротермального сжигания – НТЛ (совместно со специалистами ОИВТ РАН);
- экспериментально изучались способы утилизации побочных продуктов после НТЛ и биоремедиация сточных вод с помощью микроводорослей с последующим получением из выращенной биомассы биотоплива;
- разработана методика и проведена для ряда регионов России и стран Средней Азии оценка ресурсного потенциала МКВ для производства биотоплива.

СЕКЦИЯ 8. ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ФОТОБИОЛОГИЯ

НОВЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ И ПРОГРАММНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ КОМПЛЕКСНОЙ ОЦЕНКИ ПАРАМЕТРОВ ФОТОСИНТЕЗА МИКРОВОДОРОСЛЕЙ В БИОТЕХНОЛОГИИ И ЭКОЛОГИЧЕСКОМ МОНИТОРИНГЕ

New technical and software solutions for a comprehensive assessment of photosynthetic parameters of microalgae in photobiotechnology and monitoring of the environment

Тарас Антал^{1,2*}, **Иван Кониюхов**¹, **Алена Волгушева**¹, **Сергей Хрущев**¹,
Татьяна Плюснина¹, **Алексей Соловченко**^{1,2}

1 – Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

2 – Лаборатория комплексных экологических исследований Псковского государственного университета

*e-mail: taras_an@mail.ru, тел. +7 925 0688560

Экологический мониторинг водоемов способствует решению глобальной проблемы рационального природопользования. Как известно, фотосинтетическая способность фитопланктона является одним из ключевых показателей 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 проведение измерений в режиме реального времени в широком диапазоне концентраций хлорофилла. В связи с этим, на кафедре биофизики биологического факультета МГУ был сконструирован оптический прибор для автоматизированного измерения кинетических кривых световой индукции (ОИР кривых) и темнового затухания (реокисление Q_A) флуоресценции хлорофилла (ФХ) с высоким временным разрешением [1]. Для обработки данных были разработаны алгоритмы мультиэкспоненциального анализа, позволяющие с высокой точностью определять параметры компонент кинетических кривых. Данная система была успешно апробирована в ходе инкубации зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* в биореакторе в условиях дефицита серы. В частности, были определены наиболее чувствительные к стрессу параметры кривых. В настоящее время наша группа разрабатывает аппарат для измерения трех типов кинетических кривых (индукции быстрой и замедленной ФХ и затухания быстрой ФХ) и спектров поглощения фототрофных микроорганизмов в естественных условиях. Для автоматизации анализа больших массивов экспериментальных данных разрабатывается метод интерпретации кинетических кривых ФХ с помощью искусственных нейронных сетей. Новые разработки могут быть использованы при создании системы экологического мониторинга природных и искусственных водоемов с распределенными измерительными станциями, подключенными к облачной платформе для централизованного сбора, анализа и визуализации данных.

Работа была поддержана Российским научным фондом (грант №20-64-46018)

1. Antal T., Konyukhov I., Volgusheva A., Plyusnina T., Khruschev S., Kukarskikh G., Goryachev S., Rubin A A (2018) *Physiologia Plantarum*, 165: 476–486

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ФОТОСИНТЕЗА ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ В ПОКОЕ И ПРИ СТРЕССЕ Influence of chronic irradiation on the activity of photosynthesis of wheat seedlings at rest and under stress conditions

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

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

*e-mail: mag1355@yandex.ru, тел. +7 908 7290432

Процесс фотосинтеза за счёт своей важности для функционирования растения в целом подвержен сложной комплексной регуляции для наилучшей подстройки к условиям окружающей среды. В естественных условиях произрастания на растения одновременно могут воздействовать различные стимулы. Зачастую имеет место сочетанное действие хронического и краткосрочного быстронарастающего стрессоров. Эти воздействия вызывают различные изменения в растениях: быстронарастающие стрессоры приводят к генерации стрессовых сигналов, вызывающих быстрый ответ фотосинтеза, а хронические – к долговременным перестройкам сигнальных путей, регулирующих фотосинтетические процессы. Вопрос, влияет ли модификация, вызванная хроническим стрессором на ответ фотосинтеза на быстронарастающий стресс, является малоизученным. В настоящей работе в качестве хронического стрессора рассматривается ионизирующее излучение (ИИ), а в качестве быстронарастающего – локальное повышение температуры.

Исследования проводились на 15-дневных проростках пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) и 6-недельных растениях табака (*Nicotiana tabacum* L.) сорта Samsun, модифицированных рН-чувствительными флуоресцентным белковым сенсором Pt-GFP. В качестве источника ИИ использовался β -излучатель $^{90}\text{Sr-}^{90}\text{Y}$ с активностью 0,1 МБк и мощностью дозы примерно 31,3 мкГр/час. Облучение растений производилось непрерывно на протяжении всего периода выращивания. Содержание хлорофилла определялось при помощи хлорофиллометра. Активность фотосинтеза и интенсивность транспирации измерялась при помощи инфракрасного газоанализатора и РАМ-флуориметра. Индуцированный нагревом электрический сигнал регистрировался внеклеточно с использованием многоканальной макроэлектродной установки. Динамика рН определялась по флуоресценции сенсора Pt-GFP в установке поверхностного флуоресцентного имиджинга.

Под действием хронического облучения не происходит изменения содержания хлорофилла. Ключевые показатели световой стадии, включая Y(I) и Y(II) – квантовые выходы фотосистем 1 и 2 и NPQ – нефотохимическое тушение флуоресценции также не претерпевают существенных изменений при облучении. При этом у растений, выращенных при воздействии ИИ, наблюдается статистически значимое увеличение активности ассимиляции CO_2 – интегрального показателя фотосинтеза. Активация ассимиляции, по-видимому, объясняется увеличением устьичной проводимости, оцениваемой по величине транспирации. Как у контрольных, так и у облучённых растений локальное раздражение вызывает распространение стрессового дистанционного сигнала, который индуцирует функциональный ответ, включая изменения активности фотосинтеза. У облучённых растений обнаружено существенное усиление фотосинтетических ответов, вызываемых индуцированным локальным нагревом электрическим сигналом. Также под влиянием ИИ наблюдается нарушение корреляции между амплитудами сигнала и вызываемых ими фотосинтетических ответов. Наиболее вероятными механизмами таких изменений представляются усиливающиеся у облучённых растений ответы транспирации и сдвиги рН, сопровождающие электрический сигнал.

Работа была поддержана фондом РФФИ (проект № 19-04-01141_A).

ВЛИЯНИЕ МАГНИТНОГО ПОЛЯ С ЧАСТОТАМИ РЕЗОНАНСА ШУМАНА НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ И ГОРОХА

Е. Громова*, Е. Сухова, Ю. Синицина, Н. Мшенская, А. Рябкова, В. Воденев, В. Сухов

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

*e-mail: kater333@inbox.ru, тел. +79101428741

Основным процессом в жизнедеятельности растений является фотосинтез. Однако, на этот процесс влияет множество факторов окружающей среды, таких как свет повышенной интенсивности, низкие или высокие температуры, засуха, засоление и т.д. Эти воздействия приводят к снижению интенсивности фотосинтеза (например, снижение ассимиляции CO₂ и квантового выхода фотосистемы II), а также запускают ряд защитных реакций, которые изменяют фотосинтетическую активность (например, вызывают увеличение нефотохимического тушения NPQ, активация циклического электронного потока, изменение локализации ферродоксин-НАДФ-редуктазы, и др.) Фотосинтетические реакции связаны с переносом электронов через электрон-транспортную цепь хлоропласта и потоком ионов через тилакоидные мембраны. Учитывая, что оба процесса являются переносом заряда, они, вероятно, могут зависеть от воздействия магнитных полей (МП). МП являются важным фактором окружающей среды. С самого начала своего развития биосфера Земли находилась под воздействием различных электромагнитных полей, среди которых особое место занимают поля на частотах резонанса Шумана, образованные ионосферой. Частоты резонанса Шумана равны 7,8, 14,3, 20,8, 27,3, 33,8 Гц. Есть исследования, которые показывают влияние этих МП на рост, прорастание семян, перенос ионов, устойчивость к окружающей среде и т.д., однако, изменения в этих процессах противоречивы и эта проблема мало исследована.

В данной работе мы экспериментально проверили гипотезу о потенциальном влиянии МП интенсивности 18 мкТл с частотами резонанса Шумана на фотосинтетические реакции у растений. Исследования проводились на проростках пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт «Злата») и гороха (*Pisum sativum* L., сорт «Альбумен») 9–13-дневного возраста. Растения для кратковременного воздействия выращивали в вегетационном помещении. Для хронического воздействия растения устанавливались в систему, основанную на катушках Гельмгольца. В такой же системе оказывалось и кратковременное воздействие на исследуемые растения.

Было показано, что МП вызывает незначительное снижение квантового выхода фотосистемы II при кратковременной обработке у пшеницы. Влияние кратковременного МП на нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла было более выраженным. Этот эффект был наиболее устойчивым на частоте 14,3 Гц. В результате мы предположили, что на этой частоте можно исследовать воздействие хронического МП. При хроническом воздействии у пшеницы наблюдалось изменение квантового выхода фотосистемы II. Влияние МП на горох не наблюдалось ни при кратковременном, ни при хроническом воздействии. Таким образом мы показали, что МП с частотами резонанса Шумана может влиять на фотосинтетические реакции растения, однако, этот эффект зависит от вида растений и типа воздействия (кратковременное или хроническое).

Работа была поддержана грантом Правительства РФ (контракт №075-15-2019-1892)

ВИРУСНЫЕ ГЛИКОЗИЛАЗЫ ПРИРИМИДИНОВЫХ ДИМЕРОВ: ЭВОЛЮЦИОННЫЙ АНАЛИЗ МОРСКИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ Viral glycosylases of pyrimidine dimers: evolutionary analysis of marine sequences

А. Н. Карманова^{1,2*}, Н. А. Никулин¹, А. А. Зимин¹

1 – Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», РФ, г. Пушкино

2 – ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный естественно-научный институт» РФ, г. Пушкино
*e-mail: firetiger2011@yandex.ru, тел. +7 9531324523

Введение. Бифункциональный фермент DenV бактериофага T4 устраняет пиримидиновые димеры в ДНК – самый частый тип фотопродуктов, появляющихся в результате воздействия УФ-излучения на нуклеиновые кислоты. Механизм работы фермента схож с эксцизионной репарацией за счет его N-гликозилазной и AP-лиазной активностей [1]. Распространение DenV в природе, его происхождение, эволюция и экологическая роль – до сих пор вызывают много вопросов. Ранее нами были получены данные о распространенности DenV в метагеномах океанической микробиоты [2]. Целью данной работы являлся поиск гомологов DenV фага T4 у вирусов вод Мирового Океана для понимания путей эволюции данного фермента.

Материалы и методы. Поиск гомологов DenV Escherichia virus T4 (номер GenBank: NP_049733.1) осуществлялся по алгоритму PSI-BLAST: E-value < 3e⁻¹², таксон Viruses. Для последующего анализа были отобраны гомологи вирусов организмов, обитающих в воде. В качестве контроля были взяты DenV фагов таксона *Tevenvirinae* и гомологи из морских бактерий, найденные нами ранее [2]. Филогенетический анализ гомологов был проведен с помощью программных средств IQ-TREE и MegaX [3–4].

Результаты. Было найдено 90 гомологов DenV фагов бактерий *Shewanella* sp, *Vibrio* sp, *Roseobacter* sp, *Aeromonas* sp и вирусов водорослей *Chlorella* sp, и *Emiliania huxleyi*. Филогенетический анализ показал, что эндонуклеазы *Emiliania huxleyi* virus, *Vibrio* phage sp, *Roseobacter* phage sp близки между собой. Бактерии *Roseobacter* sp имеют кластер генов типа RcGTA – потенциально эффективный механизм горизонтального переноса генов, а также входят в фикоферуу кокколитофоридов [5]. На основе этих находок можно предположить, что DenV мог быть получен *Emiliania huxleyi* virus и *Roseobacter* phage sp. в результате горизонтального переноса генов, однако механизм переноса не ясен. У фагов – *Aeromonas* phage sp, *Pseudoalteromonas* phage, *Vibrio* phage sp, *Shewanella* phage sp могла быть общая предковая последовательность DenV, но в процессе эволюции структура данного фермента изменилась. Уже было доказано, что эндонуклеаза V *Paramecium bursaria* *Chlorella* virus 1 гомологична DenV фага T4 [6]. Гигантские вирусы хлорелл имеют в геноме большое число генов, полученных в результате горизонтального переноса от самых разных организмов. На основании удаленного расположения гомологов из *Tevenvirinae* и *Chlorella* virus sp на филогенетическом древе, мы предположили, что приобретение гена *denV* *Chlorella* virus sp является давним эволюционным событием.

Заключение. Эндонуклеаза DenV широко распространена среди фагов бактерий вод Мирового Океана и среди гигантских вирусов одноклеточных водорослей. Последние могли приобрести *denV* путем горизонтального переноса генов от других живых организмов, однако установление конкретного механизма этой передачи требует дальнейших исследований.

1. J.A. Nickoloff, M. F. Hoekstra Humana Press Inc., Totowa, (2001)
2. Karmanova A.N., Zimin A.A. *Journal of Physics: Conference Series*, Volume 1701 (2020)
3. Kumar S., et al. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547–1549 (2018)
4. Nguyen L.-T., et al *Molecular Biology and Evolution* 32:268–274 (2015)
5. Luo H, Moran MA. *Microbiol Mol Biol Rev* 78(4):573–587 (2014)
6. McCullough AK, et al *J Biol Chem*. 273(21):13136–42 (1998)

**ВЫЯВЛЕНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА
ПРОРОСТКИ ГОРОХА *Pisum Sativum* МЕТОДАМИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ**
**Identification of the toxic effect of heavy metals on pea seedlings *Pisum Sativum* using
machine learning methods**

**Диана Киселева, Роман Червицов, Дарья Тодоренко, Елена Воронова,
Сергей Хрущев, Татьяна Плюснина***

Биологический факультет Московского государственного университета
имени М. В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия
*e-mail: plusn@yandex.ru; +7 (495) 939-14-02

В работе исследуется действие тяжелых металлов на фотосинтетический аппарат (ФСА) растений. Для быстрой оценки активности ФСА широко применяется метод индукции флуоресценции хлорофилла. Форма индукционной кривой чувствительна к воздействию факторов стресса. В последнее годы объем получаемых с помощью автоматизированных измерительных приборов экспериментальных данных значительно вырос, что открывает новые возможности для применения методов анализа больших данных, в частности, методов машинного обучения.

В течение нескольких суток проводилась регистрация кривых индукции флуоресценции листьев проростков гороха *Pisum sativum*, инкубированных на питательной среде Кнопа с добавлением ионов Cu^{2+} или Cd^{2+} (20 и 50 мкМ). По полученным кривым были рассчитаны параметры JIP-теста, которые использовались как входные данные для кластерного анализа и для построения классификатора на основе алгоритма случайного леса. Для уменьшения размерности данных был использован метод главных компонент, выделялись две или три главные компоненты, которые и были использованы для дальнейшего анализа. Задачей классификатора было выявить наличие или отсутствие действия токсиканта. Точность предсказания составила 67% для Cu^{2+} и 78% для Cd^{2+} . Кластеризация проводилась тремя методами: k-средних, полной связи, и OPTICS. Оптимальное число кластеров определялось «методом локтя». Для каждого кластера были построены типичные индукционные кривые и определены соответствующие параметры JIP-теста. Было показано, что кластеры сформированы по степени подверженности растения стрессу. При этом для Cu^{2+} фактор времени инкубации вызывал больший стресс, чем действие самого токсиканта.

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ №121032500060-0 при частичной поддержке гранта РФФИ № 20-04-00465.

**РЕГУЛЯТОРНОЕ ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ БАКТЕРИЙ НА
ПРОЦЕСС ФОТОСИНТЕЗА В КЛЕТКАХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ**
**The regulatory effect of bacterial metabolites on the photosynthesis process in cells of
microalgae**

**Ольга Кокшарова^{1,4*}, Елена Воронова², Иван Конюхов², Сергей Погосян²,
Иван Бутенко³, Ольга Побегуц³, Нина Сафронова¹, Инесса Хмель⁴,
Александра Попова⁵, Владимир Плюта⁴, Вадим Говорун³, Андрей Рубин²**

1 – НИИ ФХБ имени А. Н. Белозерского, МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия
2 – Биологический факультет, МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия
3 – ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия
4 – НИЦ «Курчатовский институт» – ИМГ, Москва, Россия
5 – ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия
*e-mail: koksharova@genebee.msu.ru, тел. +7 917 5347543

Вторичные метаболиты рассматриваются как средства коммуникации микроорганизмов («infochemicals») в различных экосистемах. Каковы функции этих метаболитов в регуляции клеточных процессов фотоавтотрофных организмов? Летучие органические соединения и небелковые аминокислоты представляют собой наиболее распространенные и экологически значимые группы метаболитов. В нашей работе впервые было показано специфическое действие бактериальных кетонов на функционирование фотосистем в клетках цианобактерий [1]. Было выявлено, что кетоны ингибируют перенос электронов на донорной стороне фотосистемы 2 (ФС2) между пластохинонами Q_A и Q_B и далее к пулу пластохинонов, а также перенос электронов от антенных комплексов к реакционному центру ФС2 в клетках цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942. Эти летучие органические соединения могут выступать в роли аллелопатических инструментов при регуляции численности популяций микроводорослей в их борьбе за ограниченные общие ресурсы в экосистеме [2]. Известно, что биологически активными молекулами могут являться и небелковые аминокислоты, синтезируемые микроорганизмами и растениями. Небелковая аминокислота β -N-метиламидо-L-аланин (ВМАА) синтезируется микроводорослями (цианобактериями и диатомовыми водорослями) и накапливается в цепях питания, что приводит к развитию нейродегенеративных заболеваний у человека. Однако до сих пор оставалось неизвестным значение этой аминокислоты в метаболизме самих микроводорослей. С использованием протеомного подхода было показано, что экзогенный ВМАА в микромолярных количествах изменяет экспрессию белков, участвующих в процессе фотосинтеза в нитчатой азотфиксирующей цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120 [3]. Так, в условиях diazотрофного роста в присутствии ВМАА в клетках резко снижается содержание 18 белков, входящих в состав комплексов обеих фотосистем (ФС1 и ФС2), цитохром-b6f-комплекса, антенных пигментных комплексов, но при этом возрастает количество цитохрома c6. Также снижается экспрессия субъединицы H NAD(P)H-хинон оксидоредуктазы и пяти субъединиц АТФ-синтазного комплекса [3]. Детальные молекулярные механизмы этих изменений предстоит исследовать в системах *in vivo* и *in vitro* с помощью биофизических и генетических методов.

Работа была поддержана фондом РФФИ (грант №17-04-00412).

1. Voronova, Konyukhov, Koksharova, Popova, Pogosyan, Khmel, Rubin. Inhibition of cyanobacterial photosynthetic activity by natural ketones. *J Phycol.* 2019 doi: 10.1111/jpy.12861
2. Koksharova. Cyanobacterial VOCs as Allelopathic Tools. In: *Bacterial Volatile Compounds as Mediators of Airborne Interactions*. Springer, Singapore. 2020. https://doi.org/10.1007/978-981-15-7293-7_11
3. Koksharova, Butenko, Pobeguts, Safronova, Govorun. β -N-Methylamino-L-Alanine (ВМАА) Causes Severe Stress in *Nostoc* sp. PCC 7120 Cells under Diazotrophic Conditions: a Proteomic Study. *Toxins*. 2021. DOI: 10.3390/toxins13050325

**ДИНАМИКА ПОГЛОЩЕНИЯ СВЕТА ЛИСТЬЯМИ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ
ВАРИАЦИИ СПЕКТРАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК СВЕТОВОЙ СРЕДЫ**
**Dynamics of light absorption by plant leaves under various spectral characteristics of
the light environment**

**Татьяна Кулешова^{1,2*}, Николай Галль¹, Ольга Удалова², Игорь Черноусов²,
Гаянэ Панова²**

1 – Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе РАН

2 – Агрофизический научно-исследовательский институт

*e-mail: www.piter.ru@bk.ru, тел. +7 812 2927114

Спектры поглощения света растениями *in vivo* значительно отличаются от поглощения фотосинтетическими пигментами *in vitro*, экстрагированными из листьев [1, 2]. Этот эффект наиболее заметен в зеленой области спектра, что говорит о наличии других значимых процессов, кроме фотосинтетических, на которые световая среда оказывает ключевое воздействие.

Для измерения поглощения света листовой поверхностью растения *in vivo* разработана установка [3], включающая в себя: систему позиционирования живого листа, сбора диффузно отраженного и прошедшего сквозь фитотест-объект света; источник света с физиологически значимыми диапазонами излучения; детектор в виде оптоволоконного ПЗС-спектрометра для экспрессной регистрации спектров. Для длительного автоматического мониторинга параметров окружающей растения среды (температуры, влажности, освещенности) и состояния растительного организма (показателей роста, интенсивности поглощения света листьями) разработан неинвазивный комплекс датчиков, управляемых с помощью микроконтроллера Arduino. В основе предложенного метода фитомониторинга – анализа состояния растительного организма *in vivo*, лежит анализ динамики изменения параметров поглощения листьев растений.

Проведена серия экспериментов по исследованию влияния сложных спектров излучения на светопоглощательную способность листовой поверхности ряда растительных культур – салата, огурца и модельного объекта – хлорофитума. В качестве показателя, характеризующего потребности растения в световой энергии, предложено использовать величину, описывающую приращение поглощения света на прирост биомассы.

Измеренные значения суммарного поглощения света листьями салата в диапазоне длин волн от 400 до 700 нм варьируются в зависимости от спектральных характеристик световой среды от 42 до 62%, причем наибольшая доля поглощения приходится на синюю область от 400 до 500 нм и составляет 18–24%, для красной (600–700 нм) области характерны значения от 12 до 22% и в зеленой (500–600 нм) области листья обладают наименьшим поглощением 9–16%. С увеличением возраста растений этот разброс уменьшается, интегральное поглощение снижается. В случае избыточного поглощения (~170 $\mu\text{моль}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$) наблюдается замедленное развитие.

Таким образом, динамика поглощения света листьями растений коррелирует с условиями окружающей среды и стадией развития. Светопоглощательная способность растений меняется в зависимости от спектральных характеристик световой среды и может быть применена для отслеживания функционального состояния растительного организма.

1. Van Wittenberghe S. et al. // *Photosynthesis research*. 2019. V. 142. №. 3. P. 283–305

2. Кулешова Т.Э. и др. // *Биофизика*. 2020. Т. 65. № 1. С. 112–124

3. Kuleshova T.E. et al. // *J. Phys.: Conf. Ser.* 2018. V. 1135. 012013

**ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАДМИЯ НА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ**

Д. Н. Маторин, А. К. Садвакасова, Б. К. Заядан

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, г. Москва, Россия
Казахский национальный университет имени аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан

Изучено влияние низких концентраций ионов кадмия на процессы роста, фотосинтеза и ультраструктуру клеток микроводоросли *Ankistrodesmus* sp. При добавлении в среду кадмия в концентрациях 0.005–0.02 мг/л происходило значительное снижение числа клеток *Ankistrodesmus* sp. по сравнению с контролем. Полное прекращение роста клеток наблюдалось при добавлении кадмия в концентрации выше 0.05 мг/л. Отмечены ультраструктурные изменения в расположении тилакоидов в строме, расхождение мембран с образованием межтилакоидных пространств и существенным повышением вакуолизации клеток микроводорослей.

С использованием флуориметра M-PEA-2, позволяющим одновременно измерять в микросекундном интервале индукционные кривые флуоресценции и окислительно-восстановительные превращения компонентов ФСII, показано, что ионы кадмия ингибируют электронный транспорт в ФСII. Происходит уменьшение квантового выхода электронного транспорта в ФСII (ϕ_{E_0}), индекса производительности (PI_{ABS}) и замедление восстановления пигмента P_{700} , а также увеличение рассеивания энергии (DI_0/RC) и ΔpH -зависимого нефотохимического тушения (qE). Наиболее чувствительным параметром оказался индекс производительности (PI_{ABS}), который можно предложить для обнаружения раннего токсического действия ионов кадмия на водоросли.

Исследование выполнено в рамках Программы развития Междисциплинарной науч.-обр. школы МГУ имени М. В. Ломоносова «Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды» и грантом РФФИ №20-04-00465

**ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ВЫСОКОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ
АМАРАНТА В АРИДНЫХ УСЛОВИЯХ**
Photosynthetic bases of high productivity of new forage crops in arid conditions

Галина Настина

ФГБОУ ВО «Калмыцкий государственный университет имени Б. Б. Городовикова»

*e-mail: nastinova.ge@yandex.ru, тел. +7 9615412278

В аридных условиях оправдано использование кормовых растений с С4-типом фотосинтеза, являющийся эволюционным приспособлением к более жарким и сухим климатическим условиям [1, 2]. Кукуруза, сорго и амарант способны создавать адаптированные (т.е. максимально учитывающие природный фон), менее энергоемкие агроценозы. Адаптивное преимущество их состоит в том, что они лучше всего растут при высоких интенсивностях света и дневной температуре около 30–45°C, обладают высокой соле- и засухоустойчивостью. При этом амарант относится к аспартатным формам С4-растений, в отличие от кукурузы и сорго, представителей малатных форм. Первичными продуктами фотосинтеза у него являются дикарбоновые аминокислоты, прежде всего аспарагиновая – источник синтеза лизина, и как следствие, белка [3]. В работе использованы кукуруза (*Zea mays* L.), сорт ВИР-42; сорго (*Sorghum mellitum* Snowd.), сорта Сарваши, Ставропольское-32, Ставропольское-59, Кормовое-85, гибрид Ставропольский кормовой; амарант багряный (*Amaranthus cruentus* L.), амарант хвостатый (*A. caudatus* L.) сортообразцы Низкорослый и Высокорослый. Установлено, что исследованные культуры, характеризующаясь однотипным характером сезонного хода усвоения ФАР, имеют свои особенности, что обусловлено различиями в развитии их фотосинтетического аппарата. Усвоение ФАР агроценозами кукурузы, сорго и амаранта в начале вегетации нарастает медленно, с последующим опережением у амаранта. Агроценозы всех изучаемых культур в середине вегетации имеют короткий период с очень высоким значением к.п.д. Продолжительность этого периода у агроценозов кукурузы составляет 20 дней, у сорго – 25 дней, а у амаранта – 30 дней. У амаранта этот период совпадает с максимальными температурами воздуха. В смешанных посевах амаранта (*A. cruentus*) с кукурузой и сорго отношения приобретают характер взаимодополняемости и носят черты обоюдного влияния друг на друга (мутуализм). Благодаря более продолжительной работе ассимиляционного аппарата амаранта полидоминантные агроценозы усваивают за вегетацию больше ФАР, чем одновидовые. Увеличение продукционного процесса может происходить и за счет отсутствия у амаранта полуденной депрессии фотосинтеза и фотодыхания [4, 5]. Расширение разнообразия агроценозов за счет привлечения амаранта в соответствии с принципом дифференциации экологических ниш снижает конкуренцию за ресурсы и повышает совокупный эффект продуктивности и сбалансированности по протеину.

1. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений. – М.: Мир, – 1986, в 2-х т., – 392с
2. Жученко П.М. Мобилизация адаптивного потенциала растительных ресурсов - важнейший фактор биологизации и экологизации интенсификационных процессов в сельском хозяйстве России. // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования: Труды симпозиума. – Москва-Пушино, 1999. – С. 419–427
3. Магомедов И.М. Физиологические основы конкурентоспособности амаранта. // *Успехи современного естествознания*. – 2008. – № 5. – С. 57–59
4. Кузнецов Вл. В., Дмитриева Г. А. *Физиология растений*. – М.: Высшая школа, 2006. – 742с
5. Слонов Л. Х., Шугушева Л. Х. Экология, физиология и продуктивность амаранта. – Нальчик: Изд-во М. и В. Котляровых, 2015. – 132с

**ДИНАМИКА ГЕТЕРОГЕННОСТИ ФОТОСИСТЕМЫ II В
ПРОЦЕССЕ МИНЕРАЛЬНОГО ГОЛОДАНИЯ**
Dynamics of the photosystem II heterogeneity during mineral starvation

Татьяна Плюснина*, Наталья Дегтерева, Елена Воронова, Сергей Хрущев

Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В.

Ломоносова, Москва, 119991, Россия

*e-mail: plusn@yandex.ru; +7 (495) 939-14-02

Размер светособирающей антенны фотосистемы II (ФСII) значительно варьирует в зависимости от числа присоединенных светособирающих комплексов (ССК). Доля реакционных центров с разным размером антенны зависит от условий роста клетки и действия факторов стресса. В благоприятных условиях доминирующей формой ФСII являются т.н. α -центры, такие реакционные центры формируют димеры и образуют суперкомплексы с белками светособирающего комплекса ССК. В условиях стресса часто наблюдается увеличение доли реакционных центров с уменьшенной светособирающей антенной. К таким центрам относятся β -центры, не способные образовывать димеры и суперкомплексы с ССК и, соответственно, имеющие меньшее количество молекул хлорофилла в антенне, и γ -центры, в которых остается только коровая часть. Оценка гетерогенности светособирающей антенны ФСII может служить показателем уровня стресса, действующего на культуру водорослей. В задачу проведенной работы входило количественная оценка изменения соотношения количества α -, β - и γ -центров и размера антенных комплексов в процессе голодания культуры микроводорослей *Chlorella* при истощении в среде азота, и *Chlamydomonas* – при культивировании на среде без серы.

Отобранные на разных стадиях роста культуры образцы обрабатывали DCMU, после чего измеряли кривые индукции флуоресценции хлорофилла а при разных интенсивностях действующего света. Полученные индукционные кривые анализировали двумя методами: 1) методом представления площади над индукционной кривой в виде нескольких экспоненциальных фаз с использованием спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации (СМЭА) и 2) с помощью математической модели переходов между состояниями ФСII на основе системы дифференциальных уравнений.

Применение комплексного анализа (СМЭА, математическая модель) показало, что в течение роста культуры клеток водоросли *Chlorella* в среде с постепенным истощением азота к моменту его истощения (32-й час роста) начинают обнаруживаться β -центры. К 40-му часу роста их количество составляет 10%. Для клеток *Chlamydomonas* через 8 часов роста на среде без серы в культуре обнаруживаются 30% α -центров и 70% β -центров, к 49-му часу роста уменьшается количество α - и β -центров до 10% и 30%, соответственно, а преобладающим типом реакционных центров оказываются γ -центры – 60%. Сравнение двух методов определения гетерогенности – по площади над индукционной кривой и с помощью математической модели – показало, что если кривая индукции флуоресценции образца, обработанного DCMU в отсутствии стресса, имеет однофазный характер, т.е. присутствуют только α -центры, то при дальнейшем анализе действия стресса оба метода дают сходную оценку гетерогенности. Если же такая кривая изначально имеет две фазы, что может быть связано с медленным восстановлением P680⁺ электронами от кислород-выделяющего комплекса, то в таком случае интерпретация результатов, полученных с помощью разложения площади над индукционной кривой на фазы, значительно усложняется.

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ №121032500060-0 при частичной поддержке гранта РФФИ № 20-04-00465.

БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ЭКОЛОГИЧЕСКОМ МОНИТОРИНГЕ Biophysical methods in environmental monitoring

Сергей Погосян

Биологический факультет МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия
*e-mail: pogosyan@biophys.msu.ru, тел. +7 916 3847541

Множественность и разнообразие факторов, формирующих окружающую среду, вынуждают искать интегральные характеристики состояния среды. Разработанные к настоящему времени биофизические методы и подходы обеспечивают выполнение основных требований, предъявляемых к такого рода исследований. Методы экологического мониторинга должны быть: объективными, чувствительными, универсальными в отношении вида воздействий и типа экосистемы, иметь возможности для автоматизации измерений, позволять проведение обследований в пространстве и во времени, пригодны для широкого использования. Такой интегральной характеристикой, способной отразить экологическое состояние среды, может быть биотестирование и/или биоиндикация при помощи оптических методов. Одним из наиболее удачных методов, способных дать интегральную оценку токсичности, следует признать тестирование среды при помощи фотобактерий. Люминесцентные бактерии сочетают в себе различные типы чувствительных структур, подверженных повреждению (клеточная мембрана, метаболические реакции, генетический аппарат). Таким образом, чрезвычайно широкий круг токсинов способен снижать интенсивность свечения бактерий.

Чрезвычайно информативным для биотестирования токсичности среды оказался метод оценки состояния фотосинтетического аппарата растительных объектов по параметрам флуоресценции хлорофилла. Изменения квантового выхода флуоресценции хлорофилла под действием света высокой интенсивности (кривая индукции флуоресценции) процесс отражает кинетику восстановления переносчиков фотосинтетического аппарата. Соотношение начального значения квантового выхода флуоресценции (на слабом тестирующем возбуждении) и максимального квантового выхода (при полном восстановлении переносчиков) является показателем эффективности фотосинтеза (его КПД). Любые нарушения работы фотосинтетического аппарата, что чрезвычайно удобно регистрировать при помощи такого метода. Аппаратура проста, чувствительна и доступна. Время измерения занимает несколько секунд. На нашем съезде представлен ряд исследований по данной теме в различных методических модификациях.

В настоящее время разработаны и широко используются флуоресцентные методы оценки состояния фотосинтетического аппарата фитопланктона. Созданы приборы, позволяющие проводить измерения в пробах воды, в непрерывном потоке воды и зондировать толщу воды до глубины 200 м.

Совокупность перечисленных биофизических методов контроля дает возможность получения принципиально новой, углубленной информации об экологическом состоянии прибрежных вод [1]. Таким образом, система экологического мониторинга обширных акваторий шельфа и пресноводных акваторий для определения текущего состояния вод и надежного прогноза его изменения должна быть многоуровневой и базироваться на принципах биоиндикации фитопланктона.

1. Погосян С.И., Конохов И.В., Рубин А.Б. Проблемы экологической биофизики // М.-Ижевск: Институт компьютерных исследований. 2017. – 272с

ЦИАНОБАКТЕРИИ, ОБРАЗУЮЩИЕ ДЛИННОВОЛНОВЫЕ ПИГМЕНТЫ: РЕЗУЛЬТАТЫ РАСШИРЕННЫХ ПОИСКОВ Cyanobacteria producing red-shifted pigments: advanced assessment

Екатерина Сенатская*, Светлана Аверина, Елена Полякова, Наталия Величко,
Александр Пиневиц

Санкт-Петербургский Государственный Университет
*e-mail: senatskaya.kate.vbg@yandex.ru, тел.: +7 9052328034

Адаптация цианобактерий к дальнему красному свету (ДКС) связана с образованием длинноволновых пигментов, в частности хлорофиллов с пиком поглощения в области 700–750 нм. Несмотря на широкие поиски таких штаммов с начала XXI в. их число (особенно растущих в культуре) относительно мало. Нами протестировано 70 штаммов, хранящихся в коллекции CALU (<http://researchpark.spbu.ru/collection-csem-gus>), а также 80 новых природных изолятов. Культуры выращивали в жидкой минеральной среде BG11 при освещении видимым светом или ДКС (LED максимумом эмиссии 730–750 нм). Длинноволновые пигменты идентифицировали методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии, а также высокоэффективной жидкостной хроматографии. На спектрах светопоглощения культур, выращенных на ДКС, максимумы при >700 нм удалось обнаружить только у 11 штаммов. Спектры эмиссии флуоресценции (при длинах волн возбуждения 405 или 440 нм) содержали максимумы при 720–750 нм, свидетельствующие о присутствии длинноволновых пигментов, которые были идентифицированы как хлорофиллы (хл) *f* и *d*. Содержание хл *f* не превышало 9%, а хл *d* – 0,6% суммарного количества хлорофиллов. Локализация хлорофиллов на субклеточном уровне, которую устанавливали с помощью лазерной конфокальной сканирующей микроскопии, была относительно постоянной при разных режимах освещения. Культивируемые штаммы цианобактерий, образующих хл *f* и *d*, относятся к разным таксономическим и филогенетическим группам. Два из них (*Chlorogloeopsis fritschii* CALU 759 и *Synechocystis* sp. CALU 1173) ранее поддерживали в коллекции, а остальные (*Chlorogloeopsis* sp. A1, *Leptolyngbya* sp. Fr2, *Leptolyngbya* sp. 11-3, *Leptolyngbya* sp. A300, *Leptolyngbya* sp. A337, *Leptolyngbya* sp. Leb_dry, *Leptolyngbya* sp. Leb_rock, *Leptolyngbya* sp. Neva_2_F4 и *Leptolyngbya* sp. Neva_2_F6) являются новыми природными изолятами, полученными в ходе настоящего исследования. Они выделены из разных географических областей и экологических ниш, в частности микробных матов (3 штамма) и почвы Антарктиды (2 штамма), а также пресных водоемов умеренной зоны (4 штамма). Хотя для этих цианобактерий доступны ниши с дефицитом видимого света, широкий адаптационный потенциал позволяет им развиваться в эуфотической зоне, где они могут находиться постоянно или куда они эпизодически попадают. Штамм CALU 1173, ранее идентифицированный как *Synechocystis* sp. 6803, отнесен к новому роду *Altericista* gen. nov. Пересмотренный таксономический диагноз дан по правилам ботанического кодекса номенклатуры (ICN) и основан на совокупности фенотипических, а также генотипических признаков (нуклеотидная последовательность генов 16S рРНК, генов *gbc*-оперона и гена *groC*; специфика первичной и вторичной структуры внутреннего транскрибируемого спейсера ITS рибосомного оперона).

Исследование проведено с использованием оборудования Ресурсных центров Научного парка СПбГУ “Развитие молекулярных и клеточных технологий”, “Лазерные и оптические методы исследования вещества” и “Культивирование микроорганизмов” при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 20-04-00020).

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ФОТОСИНТЕЗ
ЛИШАЙНИКОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЭКОЛОГИЧЕСКОМ МОНИТОРИНГЕ**
Study the effects of heavy metals on lichen photosynthesis for application in
ecological monitoring

Валерия Слепнёва^{1*}, Ольга Лихачева², Алёна Волгушева¹, Тарас Антал^{1,2}

1 – Биологический факультет Московского государственного университета

им. М. В. Ломоносова

2 – Лаборатория комплексных экологических исследований Псковского
государственного университета

*e-mail: lega.ru-93@mail.ru, тел. +7 926 7033140

Повышение уровня технологического развития городов ведет к расширению масштабов промышленной деятельности человека и антропогенному воздействию на окружающую среду и усугублению экологических проблем, которые необходимо вовремя выявлять и предупреждать.

Фотосинтезирующие организмы используются в качестве естественных биоиндикаторов, поскольку фотосинтетический аппарат уязвим при воздействии неблагоприятных факторов, в том числе антропогенного происхождения. Высшие растения, особенно древесные формы, обладают довольно высокой толерантностью к неблагоприятным факторам благодаря многоуровневой системе адаптации к стрессу, поэтому низшие растения, в частности, лишайники, рассматриваются в качестве более перспективных объектов-биоиндикаторов экологического состояния лесных фитоценозов. Наличие фототрофных микроорганизмов в талломе лишайника делает возможным использование флуоресцентных методов для анализа фотосинтетической активности лишайника, в том числе *in situ*. В связи с этим мы разрабатываем подходы для анализа фотосинтетической активности лишайника в лабораторных и полевых условиях, учитывая особенности строения, физиологии и фотосинтеза этих организмов. В частности, в настоящее время проводятся исследования, направленные на выяснение возможностей и ограничений регистрации кривых индукции быстрой и замедленной флуоресценции хлорофилла, и модулированного отражения на длине волны 820 нм в талломе лишайника с помощью прибора МРЕА-2.

Выявлены виды лишайников (*Xanthoria parietina* и *Parmelia sulcata*), а так же состояния, подходящие для подобного рода измерений. Подобраны условия для изучения воздействия тяжелых металлов, в частности, хрома и кадмия, на параметры фотосинтеза водорослевого компонента лишайников в лабораторных условиях. Показано, что токсический эффект тяжелых металлов в значительной степени зависит от насыщения лишайника влагой. Так же показано, что токсический эффект проявляется в изменении ряда фотосинтетических параметров как в краткосрочных, так и в долгосрочных экспериментах.

Работа была поддержана грантом РФФИ № 20-64-46018.

**ВОЗДЕЙСТВИЕ КАДМИЯ И ХРОМА НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКУЮ
АКТИВНОСТЬ ГОРОХА (*PISUM SATIVUM* L.)**
Effect of cadmium and chromium on the photosynthetic activity of
pea (*Pisum sativum* L.)

**Дарья Алексеевна Тодоренко¹, Алёна Александровна Волгушева¹,
Дмитрий Николаевич Маторин¹, Тарас Корнелиевич Антал^{1,2*}**

1 – Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный
университет имени М. В. Ломоносова

2 – Кафедра ботаники и экологии растений, естественно-географический факультет,
Псковский государственный университет

*e-mail: taras_an@mail.ru, тел. +7 (495) 939-50-29

Изучено влияние тяжелых металлов на первичные процессы фотосинтеза в листьях гороха *Pisum sativum* L. В качестве тяжелых металлов использовали соли кадмия (CdSO_4) и хрома ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) в двух концентрациях (20 и 50 μM). Исследование проводили с помощью многофункционального анализатора эффективности растений (М-РЕА2), который позволяет подробно исследовать состояние первичных процессов фотосинтеза благодаря одновременной регистрации кинетик индукции быстрой и замедленной флуоресценции хлорофилла и кривых модулированного отражения света при 820 нм с высоким временным разрешением. Для анализа данных использовались параметры JIP теста и параметры кривых, характеризующие функциональное состояние ФС2 и ФС1, а также межсистемный электронный транспорт [1].

Наибольшую чувствительность к воздействию кадмия и хрома выявили параметры δ_{Ro} , V_{red} , и I_2/I_1 . Показано, что на ранних этапах воздействия исследуемые металлы влияют на межсистемный электронный транспорт, главным образом, ингибируя транспорт электронов между ФС2 и ФС1. Полученные результаты позволили предположить наличие сайта ингибирования для данных металлов на уровне цит.b6f комплекса. Показано, что кадмий в большей степени воздействует на работу ФС2, чем ФС1, тогда как хром ингибирует активность ФС1. По сравнению с хромом кадмий сильнее воздействует на перенос электронов через PQ пул. При более длительном воздействии высоких доз металлов эффекты становятся схожими, что проявляется, главным образом, в снижении содержания фотохимически активных центров ФС2. На основании проведенных исследований мы предлагаем использовать параметры флуоресценции такие как δ_{Ro} , V_{red} , и I_2/I_1 в качестве чувствительных индикаторов раннего загрязнения тяжелыми металлами.

Работа была поддержана фондом РФФИ (грант №20-04-00465 А) и РФФИ (№20-64-46018).

1. Todorenko D., Timofeev N., Kovalenko I., Kukarskikh G., Matorin, D., Antal T. Chromium effects on photosynthetic electron transport in pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 251, 11 (2020)

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В ПОЧВЕ И В ХВОЕ НА СОСТОЯНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА *PICEA PUNGENS* ENGELM. В НАСАЖДЕНИЯХ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА С ПРИМЕНЕНИЕМ JIP-ТЕСТОВ
Influence of heavy metals in soil and in needles on photosynthetic machinery of *Picea pungens* Engelm. grown in Saint Petersburg using JIP-tests

Александр Хмарик^{1*}, Ольга Войцеховская¹, Виктория Дубовицкая²

1 – Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, ул. Профессора Попова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия

2 – Агрофизический научно-исследовательский институт, Гражданский просп., д. 14, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: info@taxon.pro +79213094196

Показатели JIP-тестов широко применяются для оценки устойчивости фотосинтетического аппарата растений к стрессовым факторам. Однако, в качестве объектов исследования чаще всего выступают травянистые растения, произрастающие на искусственно созданных для экспериментов средах. Значительно реже данный метод используется при изучении древесных растений, произрастающих в естественных условиях и в насаждениях [1]. В данной работе анализ функционирования фотосинтетического аппарата с помощью JIP-тестов применялся для оценки стресса экземпляров ели колючей *Picea pungens* Engelm. в придорожных насаждениях. Для проверки гипотезы влияния концентрации металлов-загрязнителей почвы на фотосинтетический аппарат *Picea pungens* Engelm. в 2019–2020 гг. в трёх районах Санкт-Петербурга был проведён анализ почвы на 4-х пробных площадях, на разном удалении от проезжих частей на содержание свинца. Затем на атомно-абсорбционном спектрометре Varian AA 240 FS был проведён анализ концентраций Pb, Cd, Zn, Ni, Fe, Cu, Mn, Co на поверхности и в паренхиме однолетней и двухлетней хвои 17 экземпляров *Picea pungens* f. *glauca* и f. *argentea*, путём сравнения данных до и после отмычки хвои. Анализ параметров JIP-тестов проводился на хвое тех же самых побегов с тех же самых экземпляров. В докладе будут представлены результаты данного исследования.

1. Bantis F., Früchtenicht E., Graap J., Ströll S., Reininger N., Schäfer L., Pollastrini M., Holland V., Bussotti F., Radoglou K., Brüggemann. W. The JIP-test as a tool for forestry in times of climate change. *Photosynthetica*, 2020, 58, 409–421

АНАЛИЗ ДИНАМИКИ ОТВЕТА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА НА ДЕЙСТВИЕ СТРЕССОРОВ ПО ДАННЫМ ИНДУКЦИИ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА *a*
Dissecting the dynamics of stress responses of photosynthetic apparatus via recording of chlorophyll *a* fluorescence induction

Сергей Хрущев^{1*}, Татьяна Плюснина¹, Иван Конохов¹, Татьяна Дрозденко², Тарас Антал^{1,2}, Алексей Соловченко^{1,2}, Галина Ризниченко¹

1 – Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Биологический факультет, Ленинские Горы 1, стр. 12, Москва 119234, Россия

2 – Псковский государственный университет, площадь Ленина 2, Псков 180000, Россия

*e-mail: styx@biophys.msu.ru; +7 (495) 939-14-02

Основанные на явлении индукции флуоресценции хлорофилла *a* методы определения эффективности первичных процессов фотосинтеза широко применяются в экологическом мониторинге, агро- и биотехнологии уже несколько десятилетий. Современные автоматизированные флуориметры позволяют проводить непрерывный контроль состояния фотосинтетического аппарата (ФСА) исследуемых объектов – популяций микроводорослей, отдельных высших растений и их сообществ – в течение длительного времени. Это открывает широкие возможности для анализа динамики ответа ФСА на действие факторов внешней среды [1]. Поскольку состояние ФСА определяется действием комплекса многих факторов, то выявление роли отдельных факторов в наблюдаемом ответе представляет собой нетривиальную задачу.

Нами предложены новые экспериментальные протоколы, использование которых в сочетании с современными методами анализа данных позволяет более точно (по сравнению с классическим JIP-тестом) выявлять поврежденные участки электрон-транспортной цепи (ЭТЦ). Так, регистрация начального (OJ) участка кинетической кривой индукции флуоресценции при различающихся в несколько раз интенсивностях возбуждающего света позволяет разделить эффекты, связанные с изменением сечения поглощения светособирающей антенны и с эффективностью работы кислород-выделяющего комплекса. Метод спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации позволяет определить характерные времена отдельных процессов, а использование математической модели ЭТЦ даёт возможность сопоставить эти характерные времена со скоростями элементарных реакций в ФСА.

Важной с точки зрения практического применения является задача предсказания будущей динамики изменения функционального состояния ФСА по результатам мониторинга. Это позволит оперативно предпринимать корректирующие меры – вносить удобрения, изменять режим освещения растений в теплицах либо культур микроводорослей в фотобиореакторах, в очистных сооружениях и иных культивиационных системах. Несмотря на существенный прогресс в понимании механизмов действия факторов среды на ФСА, далеко не все механизмы изучены на достаточном уровне. Для решения прикладных задач могут применяться феноменологические модели, использующие методы машинного обучения (искусственные нейронные сети, алгоритм случайного леса и др.). Входными данными для таких моделей являются временные ряды, содержащие данные об активности отдельных компонентов ЭТЦ, оптических свойствах исследуемых объектах, а также метеорологическую, гидрофизическую и гидрохимическую информацию.

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032500060-0 при частичной поддержке гранта РФФИ № 20-64-46018 (Псковский государственный университет) и гранта РФФИ № 20-04-00465.

1. Plyusnina et al. *Photosynthetica*, 2020, 58(S1), 443–451. DOI: 10.32615/ps.2020.002

**ПРИМЕНЕНИЕ НЕЙРОСЕТЕВОГО АНАЛИЗА ИНДУКЦИОННЫХ КРИВЫХ
ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА**
Application of neural network analysis of chlorophyll fluorescence induction curves
for environmental monitoring

**Сергей Хрущев^{1*}, Татьяна Дрозденко², Татьяна Плюснина¹, Ирина Кек²,
Алёна Волгушева¹, Тарас Антал^{1,2}**

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

2 – Лаборатория комплексных экологических исследований Псковского
государственного университета, Псков, 180000, Россия

*e-mail: styx@biophys.msu.ru; +7 (495) 939-14-02

Фитопланктон является общепризнанным индикатором экологического состояния акваторий, фотосинтетический аппарат которого очень чутко реагирует на любые изменения окружающей среды. Кадмий и хром являются одними из самых распространенных тяжелых металлов и негативно влияют на первичные процессы фотосинтеза. Оба металла ингибируют электронный транспорт в фотосистеме 2 на донорной и акцепторной сторонах, снижают активность фотосистемы 1 (ФС1) и скорость фиксации CO₂ [1].

Флуоресценция хлорофилла используется в качестве чувствительного индикатора состояния процессов фотосинтеза [2]. К настоящему времени разработаны разнообразные методы оценки фотосинтетических процессов, в том числе на основе индукционных кривых хлорофилла с высоким временным разрешением (ОИР-кривая). Применение экспериментальных методов в совокупности с математическими моделями позволило выявить природу основных процессов, ответственных за появление отдельных стадий индукционной кривой [3]. На настоящий момент актуальным вопросом является создание модели, позволяющей однозначно интерпретировать ход кривой.

Нейросетевые алгоритмы получили большое распространение для обработки экспериментальных данных широкого диапазона с трудно выявляемыми закономерностями. В данной работе представлена перспективная нейросетевая модель для выявления воздействия тяжёлых металлов по индукционной кривой флуоресценции хлорофилла (ОИР кривой) измеренной на фитопланктоне. Модель апробирована на природном фитопланктоне из 9 водоёмов Псковской области, который подвергли долгосрочному воздействию солей кадмия и хрома (20 и 50 мкМ CdSO₄ и K₂Cr₂O₇) в лабораторных условиях. Точность выявления токсического действия металлов составила 90%, что указывает на перспективность данной модели для использования в экологическом мониторинге. Предполагается дальнейшее совершенствование данного метода и создание на его основе автоматизированной чувствительной системы мониторинга акваторий на предмет токсического загрязнения.

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032500060-0 при частичной поддержке гранта РФФИ № 20-64-46018 (Псковский государственный университет) и гранта РФФИ № 20-04-00465.

1. Tchounwou PB et al. (2012). doi:10.1007/978-3-7643-8340-4_6
2. Kalaji et al. (2014) *Photosynth Res*. DOI 10.1007/s11120-014-0024-6
3. Riznichenko et al. (2020) doi: 10.31857/S0006302920050063

**ОЦЕНКА ФОТОХИМИЧЕСКОГО ИНДЕКСА ОТРАЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ
ПРИ ТЕПЛОВОМ СТРЕССЕ И ПОЧВЕННОЙ ЗАСУХЕ**
Estimation of photochemical reflectance index of plants under heat stress and soil
drought

Л. М. Юдина^{*}, Е. М. Сухова, 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

В последние годы одной из ключевых проблем точного земледелия является дистанционная оценка физиологического состояния растений. Фотохимический индекс отражения (PRI), который основан на измерении интенсивностей отражения света при 531 и 570 нм, является важным инструментом для выявления краткосрочного и длительного стресса и для изучения фотосинтетических процессов у растений. В частности, PRI может быть связан с нефотохимическим тушением флуоресценции хлорофилла (NPQ) и квантовым выходом фотосистемы II (Φ_{PSII}). Однако эта связь зависит от освещенности, интенсивности стрессового воздействия, временного масштаба измерений.

Цель данной работы заключалась в анализе связи PRI с энергозависимой составляющей NPQ (NPQ_F) и Φ_{PSII} при тепловом стрессе и в условиях почвенной засухи. Исследования проводили на проростках гороха, пшеницы и тыквы, выращенных в контролируемых условиях. Для измерения PRI использовали спектрометр S-100 (SOLAR Laser Systems, Беларусь), для измерения фотосинтетических показателей использовали Dual-PAM-100 (Heinz Walz GmbH, Германия). Для создания теплового стресса использовали термостат ТВ-20 ПЗ-«К» (Касимовский приборный завод, Россия). Для создания почвенной засухи использовали прекращение полива на 5 дней со снижением относительной влажности субстрата с 12% до 0,5%.

Было показано, что тепловой стресс увеличивает NPQ_F и величину индуцированного светом изменения PRI (ΔPRI) и снижает Φ_{PSII} у растений гороха. Уменьшение Φ_{PSII} и увеличение ΔPRI наблюдались у пшеницы после нагревания, но значимые изменения в NPQ_F отсутствовали. Кроме того, у тыквы наблюдалось значительное снижение Φ_{PSII} при этом по остальным параметрам не было зарегистрировано существенных изменений. Была выявлена значительная корреляция ΔPRI и NPQ_F после нагревания, однако достоверная корреляция абсолютных значений PRI с фотосинтетическими параметрами отсутствовала.

Почвенная засуха увеличила NPQ_F, а также величину ΔPRI и снижала Φ_{PSII} у растений гороха. Величина ΔPRI сильно коррелировала с фотосинтетическими параметрами, но эта корреляция отсутствовала для абсолютного значения PRI. Таким образом, ΔPRI сильно связано с величиной NPQ_F и может использоваться как средство оценки этого параметра. Это говорит в пользу возможности использования фотохимического индекса отражения как показателя изменений физиологического состояния растений при засухе.

В целом, исследования показывают, что фотохимический индекс отражения является хорошим показателем стресса у растений, поэтому анализ PRI и ΔPRI может рассматриваться как перспективный метод дистанционного мониторинга сельскохозяйственных растений.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 17-76-20032).

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Bryant, Donald – 43
 Golbeck, John – 43
 Khozin-Goldberg, Inna – 151
 Levin, David B – 127
 Аверина, Светлана – 167
 Аверчева, Ольга – 45
 Айбуш, Арсений – 34, 76
 Акита, Фузамичи – 24
 Акчурин, Гариф – 74
 Акчурин, Георгий – 74
 Алвасел, Салех – 62
 Алиджанов, Эскендер – 97
 Аллахвердиев, Сулейман – 24, 31, 62, 127, 140
 Ананич, Татьяна – 99, 101
 Антал, Тарас – 61, 156, 168, 169, 171, 172
 Антоненко, Ю. Н. – 102, 112
 Артюхов, В. Г. – 107, 123
 Ашихмин, Александр – 25, 27, 86
 Баврина, Анна – 84, 88
 Балалаева, Ирина – 93
 Балашов, Сергей – 80
 Барулин, Николай – 101
 Бассарская, Елизавета – 45
 Башкатов, Алексей – 105, 110, 116, 118
 Бекиш, А. В. – 112
 Белашов, Андрей – 85, 92, 104
 Бельтюков, Ярослав – 119
 Беляева, Наталья – 26, 61
 Беляева, Татьяна – 85
 Бендикис, Антон С. – 86, 87
 Берцова, Юлия – 46, 75
 Бикмулина, Полина – 117
 Бирюков, Михаил – 142
 Бобровникова, Лидия – 150
 Богачев, Александр – 46, 75
 Богданов, Алексей – 138
 Бозиева, Айшат – 140
 Болдина, Ольга – 144
 Большаков, Максим – 25, 27
 Бондаренко, Г. Н. – 148
 Борзенко, С. А. – 76, 83
 Борзиков, Владимир – 84, 88
 Борисова-Мубаракшина, Мария – 47, 48, 54, 63
 Боровков, Андрей – 141
 Булычев, А. А. – 26
 Буракова, Людмила – 125, 126, 134, 136
 Бутенко, Иван – 161
 Бучарская, Алла – 116, 118
 Васильева, Людмила – 28, 41
 Васильева, Светлана – 151
 Васютинский, Олег – 85, 92, 104, 119
 Величко, Наталия – 167
 Вентуроли, Джованни – 40
 Вершубский, А. В. – 66
 Ветошкина, Дарья – 47, 48, 58
 Вечтомова, Юлия – 142
 Викс, Т. Н. – 49, 52
 Вильянен, Д. В. – 54
 Виноградова, Е. Н. – 148
 Витухновская, Л. А. – 29, 32
 Вишневская, Анна – 30
 Власкин, Михаил – 155
 Воденеев, Владимир – 157, 158
 Войцеховская, Ольга – 44, 50, 57, 144, 170
 Волгушева, Алёна – 156, 168, 169, 172
 Волошин, Роман – 31, 127
 Воронова, Елена – 160, 161, 165
 Высоцкий, Евгений – 124, 125, 126, 132, 134, 135, 136
 Габдулхаков, А. Г. – 28
 Габель, Б. В. – 143
 Габриелян, А. К. – 143
 Габриелян, Давид – 143, 150
 Галимзянов, Т. Р. – 108
 Галль, Николай – 162
 Гвоздев, Д. А. – 89
 Геворгиз, Руслан – 142
 Гельфонд, М. Л. – 92
 Генина, Элина – 105, 110, 116, 118
 Генин, Вадим Д. – 118
 Глаголева, Е. С. – 148
 Говорун, Вадим – 161
 Головки, Тамара – 51
 Голодная, Валерия – 91
 Гончаров, Сергей Е. – 87
 Горбенко, Д. А. – 104
 Горбунова, Иоанна – 119
 Горбунова, Ю. Г. – 96, 108
 Гостев, Федор – 34, 76
 Гречаник, В. И. – 154
 Григорьев, Илья – 93
 Григорьевых, Н. И. – 111
 Гринберг, Марина – 157
 Грин, Михаил – 90, 91, 100, 106, 115
 Громова, Екатерина – 68, 158
 Грязнов, Антон – 38
 Гудвилович, Ирина – 141
 Гулин, А. А. – 76
 Гульнов, Дмитрий – 124, 137
 Давлетшина, Лира – 56
 Дегтерева, Наталья – 165
 Демчук, Наталья – 91
 Дмитриева, Валерия – 50
 Домашкина, Валентина – 50
 Донцов, А. Е. – 76, 83
 Доронкина, Анна – 120, 121
 Дрозденко, Татьяна – 171, 172
 Дроздова, Ирина – 144
 Другова, Ольга – 84, 88
 Дубовицкая, Виктория – 170
 Дудинова, Ольга – 99, 101
 Дымова, Ольга – 51
 Дьяконова, Александра – 61
 Дьяченко, П. А. – 123
 Егорова, Ольга Н. – 94
 Еремеева, Елена – 124, 125, 126
 Ермаков, Ю. А. – 96
 Ефременко, Анастасия – 106
 Жармухамедов, Сергей – 31, 62, 140
 Жарова, Дарья – 144
 Жигалова, Татьяна – 45
 Жихорева, Анна – 85, 92, 104
 Заспа, А. А. – 32
 Захожий, Илья – 51
 Заядан, Б. К. – 163
 Зимин, А. А. – 159
 Зорин, Николай – 152
 Иванова, Александра – 50, 144
 Иванов, Борис – 47, 48, 54, 58, 63
 Игнатова, Анастасия – 106
 Игнатова, Людмила – 58, 63
 Именес-Мунгуя, И. – 96
 Ишемгулов, Азамат – 97
 Кабашникова, Л. Ф. – 49, 52
 Казадаева, Наталия – 120, 121
 Каприн, А. Д. – 111
 Караджан, Мехмед – 62
 Караджан, Нуркан – 62
 Карманова, А. Н. – 159
 Карпова, О. В. – 148
 Като, Коджи – 24
 Кек, Ирина – 172
 Кирил, Никита – 100
 Киселева, Диана – 160
 Киселева, Софья – 155
 Кистенев, Юрий – 116
 Клапшина, Лариса – 93, 114
 Клементьев, К. Е. – 26
 Клемина, Ирина – 38
 Коваленко, Илья – 61, 70
 Козлова, Екатерина – 120, 121
 Козлов, Антон С. – 87, 94, 95
 Козлова, Татьяна – 127
 Козулева, Марина – 35, 47, 53, 54, 58, 63
 Кокшарова, Ольга – 161
 Колесник, Ольга В. – 131
 Конопацкова, О. М. – 105
 Константинова, А. Н. – 96, 108
 Конюхова, Юлия – 120, 121
 Конюхов, Иван – 156, 161, 171
 Коппель, Л. А. – 77
 Корнилова, Елена – 85
 Королев, Константин – 55
 Коротов, Игорь – 128
 Котова, Е. А. – 102, 112
 Кочетова, Галина – 45, 60
 Кочубей, Вячеслав – 120, 121
 Кошелева, Настасья – 117
 Красновский, Александр – 86, 87, 94, 95, 122
 Кратасюк, Валентина – 129, 137
 Креславский, Владимир – 62, 82
 Крицкий, М. С. – 79
 Крученок, Юлия – 101
 Крысько, Дмитрий – 93
 Кудрявцев, Александр Н. – 130
 Кудряшева, Надежда С. – 131
 Кузинова, Я. К. – 105
 Кулешова, Татьяна – 162
 Куприянова, Елена – 140
 Ладиллина, Елена – 93
 Лазарева, Е. Н. – 105
 Лантух, Юрий – 97
 Ларионова, Марина – 126, 132, 135

- Лауринавичене, Татьяна – 113, 149
 Лелеков, Александр – 145
 Лермонтова, Светлана – 93, 114
 Легута, Сергей – 97
 Леусенко, Игорь – 99, 101
 Литвинов, Илья – 85
 Лихачева, Ольга – 168
 Лобакова, Елена – 151
 Ловягина, Елена – 56
 Локтюшкин, Алексей – 56
 Ломакина, Г. Ю. – 133
 Лось, Д. А. – 143
 Лукашев, Евгений – 80
 Лукьянов, Александр – 151
 Лукьянов, Константин – 138
 Любицкий, Олег Б. – 95
 Любова, Татьяна – 93
 Майорова, Екатерина – 59, 146
 Макринский, К. И. – 96
 Максимов, Владимир – 74
 Максимов, Евгений – 65, 78, 138
 Малеева, Ю. В. – 79
 Маликова, Наталья – 124, 126, 134
 Малиновская, Светлана – 84, 88
 Мамедова, А. М. – 32
 Мамедов, Махир – 29, 32, 40, 46, 75, 80
 Маркелова, А. Г. – 143
 Маркова, Светлана – 126, 128, 132, 135
 Маслаков, Алексей – 61, 70
 Маторин, Дмитрий – 163, 169
 Махнева, Зоя – 25, 27, 38
 Медведков, Олег И. – 94
 Мешков, И. Н. – 96
 Микулич, Александр – 99, 101
 Милановский, Георгий – 29, 30, 33, 35, 40
 Миронов, Андрей – 90, 98, 106, 115
 Мишин, Александр – 138
 Миязаки, Наюки – 24
 Морозова, Н. Б. – 115
 Москаленко, Андрей – 25, 27, 38, 86
 Мудрак, Дмитрий – 116
 Муртузова, Александра – 57
 Мшенская, Н. – 158
 Мыльников, Артём – 120, 121
 Наволокин, Никита – 116
 Нагао, Рио – 24
 Нагорный, Роман – 99
 Надеева, Елена – 48
 Надеева-Журикова, Елена – 58, 63
 Надточенко, Виктор – 34
 Найдов, Илья – 47, 48, 54, 58
 Настинова, Галина – 164
 Наташин, Павел – 126, 136
 Неверов, К. В. – 79
 Немцева, Елена – 137
 Немцова, Юлия – 157
 Нехаев, И. С. – 123
 Нехорошев, Михаил – 142
 Никулин, Н. А. – 159
 Новикова, Татьяна – 147
 Обухов, Ю. Н. – 79
 Окушко, С. С. – 111
 Осипов, Анатолий Н. – 95
 Островерхов, Петр – 100, 106
 Островский, Д. С. – 83
 Островский, М. А. – 76, 83
 Павлова, М. А. – 115
 Павлов, П. Б. – 54
 Палкина, П. Е. – 107
 Панкова, С. М. – 123
 Панкратов, А. А. – 115
 Панова, Гаянэ – 162
 Панченко, П. А. – 115
 Пашковский, Павел – 82
 Петрова, Анастасия – 30, 33, 34, 35, 43
 Петрова, Дарья – 100
 Петровская, Лада – 80, 81
 Петушкова, Екатерина – 59, 146, 153
 Пиневиц, Александр – 167
 Пищальников, Роман Ю. – 36
 Плавская, Людмила – 99, 101
 Плавский, Виталий – 99, 101
 Плюснина, Татьяна – 61, 70, 156, 160, 165, 171, 172
 Плюта, Владимир – 161
 Плюгинская, А. Д. – 115
 Побегуц, Ольга – 161
 Погорилый, В. А. – 90
 Погосян, Сергей – 161, 166
 Позднякова-Филатова, Ирина – 48
 Полякова, Елена – 167
 Попова, Александра – 161
 Попова, Л. Б. – 102
 Правдин, Александр – 120, 121
 Притьмов, Д. А. – 115
 Прокопьев, В. Е. – 103
 Проскуряков, Иван – 37, 38
 Протасова, Елена – 138
 Птушенко, В. В. – 60, 148
 Птушенко, О. С. – 60, 148
 Пуртов, Константин – 139
 Путинцева, О. В. – 107
 Раздобреев, Дмитрий – 97
 Разживин, Андрей П. – 36
 Ривкина, Елизавета – 81
 Ризниченко, Галина – 26, 61, 70, 171
 Родионова, Маргарита – 62
 Рожко, Татьяна В. – 131
 Романова, Анастасия – 149
 Ростиашвили, Евгения – 100
 Рочев, Юрий – 117
 Рубин, Андрей – 26, 39, 61, 70, 161
 Руденко, Наталья – 47, 48, 63
 Рябкова, Анастасия – 68, 158
 Савченко, Г. Е. – 52
 Савченко, Татьяна – 64
 Садвакасова, А. К. – 163
 Сакина, Н. Л. – 76
 Сасин, Максим – 119
 Сафронова, Нина – 161
 Селиханов, Г. К. – 28
 Семенова, Галина – 64
 Семенова, Ирина – 85, 92, 104
 Семенов, Александр – 119
 Семенов, Алексей – 29, 30, 32, 33, 34, 35, 40, 43
 Сёмин, Борис – 56
 Сенатская, Екатерина – 167
 Сергей, Тихонов – 91
 Сердюченко, Николай – 101
 Серебрякова, И. А. – 105, 110
 Силецкий, Сергей – 80
 Синетова, Мария – 140, 143, 150
 Синещёков, В. А. – 77
 Синицина, Ю. – 158
 Скапцов, Александр – 120, 121
 Слепнёва, Валерия – 168
 Слуцкая, Е. А. – 65
 Случанко, Н. Н. – 65
 Собчук, Андрей – 101
 Соколова, Л. О. – 107
 Соколова, Мария – 106
 Соколов, В. С. – 96, 108
 Соловченко, Алексей – 148, 151, 156, 171
 Спирина, Елена – 81
 Стариков, Александр – 150
 Стародубов, Александр – 152, 153
 Старыгина, Полина – 109, 113
 Степанов, А. В. – 65
 Степанькова, Светлана – 100
 Строкина, Валерия – 82
 Суворов, Н. В. – 90
 Суковатый, Лев – 137
 Сундырева, Мария – 64
 Сурков, Ю. И. – 105, 110
 Сусличенко, И. С. – 66
 Суханов, Артемий – 81
 Сухова, Екатерина – 67, 68, 158, 173
 Сухов, Владимир – 50, 67, 68, 158, 173
 Сысов, Валерий – 99, 101
 Телегина, Таисия – 142
 Терентьев, Василий – 69, 72
 Терентюк, Георгий С. – 118
 Тимашев, П. С. – 117
 Тихонов, А. Н. – 66
 Тихонов, С. И. – 90
 Тодоренко, Дарья – 160, 169
 Томо, Татцуя – 24
 Третчикова, О. А. – 28
 Третьякова, Антонина – 99, 101
 Трофимова, Н. Н. – 76
 Трубицин, Б. В. – 66, 148
 Тучин, Валерий – 105, 110, 116, 118
 Тютерева, Елена – 50, 57, 144
 Угарова, Н. Н. – 133
 Удалова, Ольга – 162
 Федоров, А. К. – 96
 Фёдорова, О. А. – 115
 Федоров, Владимир – 61, 70
 Федорчук, Татьяна – 47, 63
 Фельдман, Т. Б. – 76, 83
 Феофанов, Алексей – 106
 Филоненко, Е. В. – 111
 Фирсов, А. М. – 112
 Фомич, М. А. – 112
 Франк, Людмила А. – 130
 Фуфина, Татьяна – 28, 41
 Халилова, Лейла – 62
 Хасимов, Махмадусуф – 152, 153
 Хатыпов, Равиль – 41
 Хлебцов, Николай Г. – 118
 Хмарик, Александр – 170

Хмель, Инесса – 161
Холявка, М. Г. – 123
Хоробрых, Андрей – 64
Христин, Антон – 41
Хрущев, Сергей – 61, 70, 156, 160, 165,
171, 172
Хубецова, М. Х. – 76, 83
Худякова, Александра – 82
Хуснутдинова, Анна – 109, 113, 152, 153
Цыганков, Анатолий – 59, 109, 113, 149,
152, 153, 154
Чеканов, К. А. – 42
Червицов, Роман – 160
Черепанов, Дмитрий – 33, 34, 35, 43
Чернова, Надежда – 155
Черноусов, Игорь – 162
Чивкунова, О. Б. – 148
Чудакова, Ольга – 109, 113
Шалюхина, София – 45
Шамаль, Наталья – 71
Шарко, О. Л. – 112
Шелаев, Иван – 34, 43
Шелягина, Анастасия – 100
Шен, Жиан-Рен – 24
Шестакова, Лидия – 114
Шибзухова, К. А. – 148
Шилягина, Наталья – 93, 114
Шинода, Тошиюки – 24
Шманай, В. В. – 112
Шор, Е. А. – 77
Шпичка, Анастасия – 117
Шукшина, Анна – 69, 72
Шумилова, Суюкум – 31
Щепинов, М. С. – 112
Юдина, Любовь – 68, 173
Юдинцев, Андрей – 114
Юстус, Г. С. – 115
Юсупов, Владимир – 117
Яковлева, М. А. – 76, 83
Янина, Ирина – 116, 120, 121
Яныкин, Денис – 64



ООО «КОМПАНИЯ ХЕЛИКОН» — с 1997 года один из ведущих российских поставщиков оборудования, реактивы и расходных материалов для клеточной и молекулярной биологии, ориентированный на внедрение новейших разработок в российскую лабораторную практику.

Направления деятельности:

- молекулярная и клеточная биология,
- биоиндустрия,
- криминалистика,
- ветеринария,
- пищевая безопасность,
- клиническая диагностика.

Продуктовое портфолио включает более 40 мировых брендов, среди которых Bio-Rad, Beckman Coulter, Qiagen, MGI, Eppendorf, Corning, Fluidigm, BMGLabtech, Merck, SSI, Alsheng и др.

Компания имеет R&D и производственную базу и выпускает лабораторную продукцию под собственной маркой «Хеликон»: оборудование, расходные материалы и комплектующие для вертикального и горизонтального электрофореза, системы гель-документирования, штативы для пробирок и дозаторов и др., лабораторная мебель.

Особенностью работы с компанией является возможность бесплатного тестового использования некоторых видов продукции до принятия решения о ее покупке. Доставка и установка в лаборатории Клиента осуществляется за счёт Компании Хеликон.

Наличие развитой логистической и складской сети позволяет доставлять заказы в кратчайшие сроки. Региональные представительства компании находятся в Санкт-Петербурге, Новосибирске, Казани, Ростове-на-Дону, Воронеже и Екатеринбурге.

Контакты:

ООО «Компания Хеликон»
121374, Москва, Кутузовский проспект, д. 88
8 800 770 71 21 (бесплатно для всей России)
+7 499 705 50 50 (в Москве)

mail@helicon.ru
www.helicon.ru

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

Подписано в печать 01.09.2021 г.

Печать цифровая

Заказ номер 36

Тираж: 100 экз.

Типография "Пятый формат"
г. Серпухов, ул. Водонапорная 36

+7 (977) 896-47-26

<http://5-format.ru>

ISBN 978-5-9905822-4-8



9 785990 582248