



РОССИЙСКОЕ ФОТОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО
МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. М.В. ЛОМОНОСОВА
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
РОССИЙСКИЙ ФОНД ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
МИНИСТЕРСТВА ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
АНАЛИТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР МЕЖДУНАРОДНЫХ
НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ПРОГРАММ

VI Съезд

Российского фотобиологического общества

пос. Шепси, 15–22 сентября 2011 г.

Материалы съезда

Москва 2011

*В настоящем сборнике представлены материалы VI съезда
Российского фотобиологического общества. Сборник предназначен для
широкого круга биологов, химиков и физиков, интересующихся проблемами
фотобиологии.*

*Ответственный редактор: д.ф.-м.н. И.И. Проскуряков
Ответственный за выпуск: Г.В. Митенко*

ISBN 978-5-9562-0081-0

© ИФПБ РАН, 2011

© НИИ-Природа, 2011

© Российское фотобиологическое общество

ОБРАЩЕНИЕ К УЧАСТНИКАМ

Дорогие коллеги!

Мы рады приветствовать вас на VI съезде Российского фотобиологического общества, который проводится в пансионате Маяк поселка Шепси Краснодарского края. Мы благодарны коллегам из Института химической физики РАН, впервые проложившим дорогу в это прекрасное место. Наш съезд проводится при поддержке Министерства образования и науки РФ и Российского фонда фундаментальных исследований. В организации съезда принял участие Аналитический центр международных научно-технологических и образовательных программ (МНиОП).

Программа съезда включает следующие секции:

1) Первичные процессы фотосинтеза (организаторы: В.А. Шувалов, В.В. Климов, И.И. Проскураков);

2) Регуляция фотосинтеза (организаторы: А.Н. Тихонов, Б.Н. Иванов, И.Г. Стриж);

3) Фоторецепция (организаторы: М.А. Островский, В.А. Синещёков, М.С. Крицкий);

4) Биомедицинские приложения фотофизики и фотохимии (организаторы: А.П. Савицкий, Н.Н. Угарова, А.Я. Потапенко, В.А. Надточенко, Е.С. Высоцкий);

5) Биофотоника (организаторы: Ю.А. Владимиров, В.В. Тучин, А.А. Красновский, Н.М. Шахова, Е.В. Загайнова).

На съезде будут представлены 190 устных и стендовых докладов. Среди участников – 59 докторов наук и 86 кандидатов наук, 45 аспирантов и студентов. На нашем съезде будут коллеги из Азербайджана, Белоруссии, Литвы и Украины. Россия будет представлена 16 городами, включая Воронеж, Красноярск, Махачкалу, Москву, Нижний Новгород, Пушкино, Ростов-на-Дону, Санкт-Петербург, Саратов, Сочи, Сыктывкар, Томск, Троицк,

Ульяновск, Уфу и Якутск; Украина – 4 городами – Киевом, Дзержинском, Донецком и Черкассами. Такое количество участников свидетельствует о непрекращающемся интересе научного сообщества к фотобиологии и о том, что наша область науки активно развивается.

Мы приветствуем вас на VI съезде Российского фотобиологического общества в поселке Шепси и надеемся, что программа окажется интересной, а окружающая природа будет способствовать научным успехам.

От имени Оргкомитета съезда

Президент Российского
фотобиологического общества,
профессор

А.Ю. Семенов

ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ:

Сопредседатели:

А.Ю. Семёнов – Институт физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского МГУ (НИИФХБ МГУ)

В.А. Шувалов – Институт фундаментальных проблем биологии РАН
(ИФПБ РАН)

Ученый секретарь: Е.А. Котова. (НИИФХБ МГУ)

Члены Оргкомитета:

Ю.А. Владимиров, Российский гос. медицинский университет

Е.С. Высоцкий, Институт биофизики СО РАН

Е.В. Загайнова, Нижегородская гос. медицинская академия

Б.Н. Иванов, ИФПБ РАН

В.В. Климов, ИФПБ РАН

Л.А. Кошпель, Биологический факультет МГУ

А.А. Красновский, Институт биохимии РАН

М.С. Крицкий, Институт биохимии РАН

И.Р. Куклина, Аналитический центр МНиОП

М.Д. Мамедов, НИИФХБ МГУ

В.А. Надточенко, Институт проблем химической физики РАН

М.А. Островский, Институт биохимической физики РАН

А.Я. Потапенко, Российский государственный медицинский
университет

И.И. Проскуряков, ИФПБ РАН

А.Б. Рубин, Биологический факультет МГУ

А.П. Савицкий, Институт биохимии РАН

В.А. Синещёков, Биологический факультет МГУ

И.Г. Стриж, Биологический факультет МГУ

А.Н. Тихонов, Физический факультет МГУ

В.В. Тучин, Физический факультет СГУ

Н.Н. Угарова, Химический факультет МГУ

Н.М. Шахова, Нижегородская государственная медицинская академия

Секция 1

ПЕРВИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ ФОТОСИНТЕЗА

ВСТРАИВАНИЕ КАРОТИНОИДОВ В ПИГМЕНТ-БЕЛКОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ СЕРНЫХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Carotenoid reconstitution into pigment-protein complexes from
sulfur photosynthetic bacteria

Александр АШИХМИН, Максим БОЛЬШАКОВ, Зоя МАХНЕВА,
Андрей МОСКАЛЕНКО

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пушкино,
Московская область, 142290, Россия;
E-mail: alex-asch@rambler.ru; Fax: +7-496-73-305-32

В процессе фотосинтеза участвуют пигменты хлорофиллового ряда и каротиноиды, которые локализованы в пигмент-белковых комплексах (ПБК). Фотосинтезирующие бактерии, обладающие самым простым фотосинтетическим аппаратом, содержат, как правило, два светособирающих ПБК: периферийный (LH2) и прицентровой (LH1). Последний окружает реакционный центр, образуя ансамбль LH1-RC. Для изучения функций каротиноидов необходимо сравнить свойства образцов как с каротиноидами, так и без них. Однако бескаротиноидные мутанты содержат один тип светособирающего ПБК, который по ряду параметров отличается от контрольных ПБК. Использование ингибитора ДФА позволяет получить бескаротиноидные бактерии с сохранением полного набора светособирающих ПБК, которые не изменяют своих спектральных характеристик.

Объекты исследования – бактерии *Allochrochromatium minutissimum* (основной каротиноид родопин) и *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* (ангидрородовибрин и спириллоксантин) со спириллоксантиновым путем биосинтеза каротиноидов. Они одни из немногих бактерий, у которых биосинтез каротиноидов может быть почти полностью подавлен ингибитором. Изучена возможность встраивания *in vitro* общих экстрактов каротиноидов из *Alc. minutissimum*, *Ect. haloalkaliphila*, *Rps. rubrum* в бескаротиноидные ПБК из данных бактерий. При использовании собственного экстракта каротиноидов удалось встроить 80–90% каротиноидов в оба комплекса. В комплекс LH1 из *Alc. minutissimum* встраивался преимущественно спириллоксантин (89,7%), а в комплекс LH2 – родопин (68,1%). Добиться встраивания спириллоксантина удалось только в небольшую фракцию комплекса LH2. При встраивании каротиноидов в ПБК из *Ect. haloalkaliphila* в обоих комплексах основными являются родопин (23%), спириллоксантин (26%) и ангидрородовибрин (24%). Изучены спектральные и биохимические характеристики комплексов со встроенными каротиноидами (спектры поглощения, КД, флуоресценции и возбуждения флуоресценции, фотоустойчивость и термостабильность). По этим характеристикам изученные комплексы похожи на контрольные образцы, что свидетельствует о правильности встраивания каротиноидов в комплексы LH2 и LH1-RC. Исследован процесс восстановления биосинтеза каротиноидов (встраивание *in vivo*) у *Ect. haloalkaliphila* как в мембранах, так и в выделенных из них комплексах LH2 и LH1-RC. На первых стадиях преобладают каротиноиды из ранних этапов биосинтеза (фитоин, фитофлуин и ζ-каротин), которые затем постепенно замещаются каротиноидами из более поздних этапов биосинтеза (ангидрородовибрин, спириллоксантин и родопин). Разные типы каротиноидов при встраивании в ПБК не изменяют спектральные характеристики полос поглощения БХл.

Работа выполнена при частичной поддержке госконтракта с Роснаукой №02.740.11.0293 и гранта президента РФ НШ-4525.2008.4.

**РОЛЬ КАРОТИНОИДОВ В ПРОЦЕССЕ ФОТООКИСЛЕНИЯ
БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА *IN VIVO***
Carotenoids role in the process of bacteriochlorophyll photooxidation *in vivo*

Максим БОЛЬШАКОВ, Зоя МАХНЕВА, Андрей МОСКАЛЕНКО

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Московская область,
142290, Россия;
E-mail: lfbv22@gmail.com; Fax: +7-496-73-305-32
Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino,
Moscow Region, Russia
E-mail: shuvalov@issp.serpukhov.su

Каротиноиды в фотосинтезе выполняют несколько функций. Одна из них – это защита Бхл от окисления синглетным кислородом. Они тушат либо триплет Бхл, препятствуя образованию синглетного кислорода, либо сам синглетный кислород. При сравнении процесса фотовыцветания пигментов в клетках *Alc. minutissimum* с каротиноидами и без них на белом свете было установлено факт, который противоречил общепринятым представлениям о функциях каротиноидов: в присутствии каротиноидов облучение клеток белым светом приводило к резкому выцветанию полосы Бхл850 комплекса LH2 и образованию продукта окисления Бхл (698 нм). В бескаротиноидных образцах скорость фотовыцветания полосы Бхл850 резко снижалась и продукт окисления Бхл отсутствовал. Регистрация спектра действия этого процесса показала, что он совпадает со спектром поглощения каротиноидов (420–550 нм). Другие пигменты (Бхл или фоторецепторы, которые обнаружены в последнее время у фотосинтезирующих бактерий) не активировали фотоокисления Бхл. На этом основании был сделан вывод, что фотовыцветание (окисление) полосы Бхл850 связано с действием света на каротиноиды. Дальнейшая работа проводилась при освещении мембран *Alc. minutissimum* с разным содержанием каротиноидов сине-зеленым светом, который вырезали светофильтрами ЖС-4 и СЗС-22.

Изучены: а) влияние концентрации и состава каротиноидов в образце на фотоокисление Бхл850 и установлено, что процесс не идет только в бескаротиноидных образцах; б) гетерогенность комплексов LH2 по каротиноидному составу и показано, что в пределах одной популяции комплексов существуют пулы комплексов с разным содержанием каротиноидов или без каротиноидов; в) влияние процесса фотовыцветания Бхл850 на структуру LH2 комплексов и выяснено, что окисление Бхл не влияет на целостность структуры комплексов LH2; г) продукт фотоокисления Бхл и он идентифицирован как 3 ацетил-хлорофилл; д) влияние ловушек синглетного кислорода на процесс фотоокисления Бхл и установлено, что они его замедляют или останавливают. Проведена серия экспериментов по восстановлению процесса фотовыцветания Бхл 850 в бескаротиноидных LH2 комплексах, путем встраивания в них каротиноидов. Установлено, что они встраиваются избирательно (более подробно см. Ашихмин и др.). В образцах со встроенными каротиноидами полностью восстанавливался процесс фотоокисления Бхл. На основании совокупности полученных данных сделан вывод о том, что некоторые каротиноиды способны под действием света к образованию синглетного кислорода.

Работа выполнена при частичной поддержке госконтракта с Роснаукой №02.740.11.0293 и гранта президента РФ НШ-4525.2008.4, а также гранта РФФИ №09-04-00925а.

**МУТАНТНЫЕ РЕАКЦИОННЫЕ ЦЕНТРЫ *Rba. sphaeroides*
С МОДИФИЦИРОВАННЫМ БЕЛКОВЫМ ОКРУЖЕНИЕМ
БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛОВ**

Mutant reaction centers of *Rba. sphaeroides* with modified protein environment in bacteriochlorophylls vicinity

**Людмила ВАСИЛЬЕВА, Татьяна ФУФИНА, Мария ЛЕОНОВА, Равиль ХАТЫШОВ,
Владимир ШУВАЛОВ**

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Московская область,
142290, Россия;

E-mail: vsyulya@mail.ru; Fax: +7-4967-33-05-32;

В реакционных центрах (РЦ) фотосинтеза происходит превращение световой энергии в энергию химических связей. Квантовая эффективность преобразования света в РЦ на начальных этапах фотосинтеза составляет почти 100%. Относительно просто организованные и хорошо изученные бактериальные РЦ представляют собой удобную модель для управления параметрами фотосинтетического электронного транспорта и исследования отдельных стадий этого процесса. Использование спектральных методов в сочетании с молекулярно-биологическими и биохимическими подходами открывает путь к пониманию механизмов, обеспечивающих высокую эффективность функционирования фотосинтетических РЦ. Реакционный центр пурпурной бактерии *Rba. sphaeroides* состоит из трех полипептидов и десяти кофакторов – 4-х молекул БХл a , 2-х молекул БФео a , 2-х молекул убихинона, атома негемового железа и молекулы каротиноида. Кофакторы РЦ образуют 2 цепи переноса электрона, но только одна и них, А-цепь, функционально активна. В бактериальном РЦ перенос электрона начинается после фото-возбуждения первичного донора электрона, димера бактериохлорофилла (БХл) Р, от которого электрон передается по А-цепи кофакторов с периферической на цитоплазматическую сторону мембраны. Белковое окружение первичного донора Р может оказывать влияние как на свойства димера БХл, так и на эффективность фотохимического разделения заряда. С помощью метода направленного мутагенеза, позволяющего локально изменять структуру белка, в РЦ *Rba. sphaeroides* были внесены аминокислотные замещения M210 Tyr-Leu, M197 Phe-Tyr, M182 His-Lue, L168 His-Leu, L153 His-Lue (Cys, Met, Tyr), L177 Ile-His и другие. Показано, что взаимодействие полярной OH_2 группы Tyr M210 с заряженными молекулами БХл P^+ и V_A^- ускоряет разделение зарядов между ними и стабилизирует состояние с разделенными зарядами P^+V_A^- . Замещение гистидина L153, координирующего атом магния БХл V_A на аминокислотные остатки, не способные к лигандированию Mg, дестабилизируют РЦ, но феофитинизации V_A при этом не происходит. Двойная мутация H(L153)Y+H(M182)L приводит одновременно к замене молекулы БХл V_B на молекулу БФео (Φ_B) и к потере мономерного БХл V_A и перенос электрона в таких РЦ идет только по В-цепи с образованием состояния с разделенными зарядами $\text{P}^+\Phi_B^-$. Замещение изолейцина L177 на гистидин в окружении БХл P_A и V_B влияет на взаимодействие этих хромофоров с белком, приводя в шести-координированию атома магния БХл V_B и появлению ковалентной связи между БХл P_A и L-субъединицей РЦ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям Российской академии наук, программы «Молекулярная и клеточная биология», гранта Президента Российской Федерации (№ НШ-3201.2010.4) и РФФИ (грант 09-04-00109).

FTIR СПЕКТРОСКОПИЯ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ *CHLOROFLEXUS AURANTIACUS*

FTIR spectroscopy of reaction centers from *Chloroflexus aurantiacus*

Алексей ЗАБЕЛИН, Валентина ШКУРОПАТОВА, Владимир ШУВАЛОВ,
Анатолий ШКУРОПАТОВ

Учреждение Российской академии наук Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Московская область, 142290, Россия;
E-mail: zabelin1982@mail.ru; Fax: +7(4967)33-05-32;

Реакционные центры (РЦ) термофильной зеленой несерной бактерии *Chloroflexus (Cfl.) aurantiacus* сходны, но не идентичны, по фотохимическим свойствам с РЦ пурпурных бактерий, значительно отличаясь от них по пигментному и белковому составу. Поэтому сравнительные исследования РЦ *Cfl. aurantiacus* и пурпурных бактерий представляют большой интерес в связи с выяснением факторов, определяющих направленность и высокую эффективность процесса первичного разделения зарядов в бактериальном фотосинтезе. Структура РЦ пурпурных бактерий с высоким разрешением была получена методом рентгеноструктурного анализа. Для РЦ *Cfl. aurantiacus* такие данные отсутствуют. Метод фотоиндуцированной дифференциальной инфракрасной спектроскопии с Фурье преобразованием (FTIR) позволяет наблюдать молекулярные изменения, связанные с фотоиндуцированным разделением зарядов между кофакторами РЦ.

В данной работе метод фотоиндуцированной дифференциальной FTIR-спектроскопии применялся для исследования фотоокисления первичного донора электрона Р с образованием состояния $P^+Q_A^-$ и фотовосстановления бактериофеофитинового акцептора электрона H_A в РЦ *Cfl. aurantiacus*. Анализ FTIR-спектров $P^+Q_A^-/PQ_A$ и H_A^-/H_A РЦ *Cfl. aurantiacus* проводится на основе сравнения с аналогичными хорошо охарактеризованными FTIR-спектрами РЦ *Rhodobacter (Rba.) sphaeroides* R-26. Присутствие специфического электронного перехода в совокупности с сопряженными колебательными (фазово-фононными) полосами в FTIR-спектре $P^+Q_A^-/PQ_A$ РЦ *Cfl. aurantiacus* свидетельствует о том, что катион-радикал P^+ в данных РЦ представляет собой гомодимер, состоящий из двух электронно-сопряженных молекул бактериохлорофилла *a* (P_A и P_B). Электронная организация димерного катион-радикала P^+ в РЦ *Cfl. aurantiacus* характеризуется частичной делокализацией положительного заряда между молекулами P_A и P_B с некоторой асимметрией в распределении заряда в пользу P_A . Показано, что FTIR-спектры H_A^-/H_A РЦ *Cfl. aurantiacus* и *Rba. sphaeroides* R-26 демонстрируют как явные сходства, так и существенные различия в области валентных колебаний карбонильных групп. Полученные данные обсуждаются в рамках модели, предполагающей образование слабой водородной связи между глутамином L143 и 13¹-кето С=О группой бактериофеофитина H_A в РЦ *Cfl. aurantiacus* как в нейтральном, так и в анион-радикальном состоянии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 10-04-01308), Министерства образования и науки Российской Федерации, Президиума РАН (программы «Молекулярная и клеточная биология» и «Нанотехнологии и наноматериалы»), Гранта Президента РФ, НШ-3201.2010.4.

**МИГРАЦИЯ ЭНЕРГИИ В ГИБРИДНЫХ КОМПЛЕКСАХ
ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ НАНОКРИСТАЛЛОВ И ВОДОРАСТВОРИМЫХ
ПОРФИРИНОВ**

**Energy migration in hybrid complexes of semiconductor nanocrystals
and soluble porphyrins**

**Вадим ЗАГИДУЛЛИН¹, Евгений МАКСИМОВ¹, Юрий БОРИСЕВИЧ²,
Владимир ПАЩЕНКО¹.**

¹Кафедра биофизики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Россия

E-mail: vad-zag@yandex.ru; Tel: +7-495-939-48-45;

²Universidade de São Paulo, 14040901 – Ribeirão Preto, SP – Brasil.

Полупроводниковые нанокристаллы – квантовые точки (КТ) – обладают уникальными оптическими характеристиками, такими как большое сечение поглощения, исключительно высокая фотостабильность, широкий спектр поглощения и узкая полоса фотолюминесценции. Квантовый выход флуоресценции КТ достигает 70%, а их коэффициент экстинкции в десятки раз превышает коэффициенты экстинкции органических красителей [1,2]. Кроме того, положение максимума эмиссии КТ определяется их диаметром. Современные исследования показывают, что КТ могут быть использованы в качестве дополнительных светосборщиков для нативных пигмент-белковых комплексов, КТ обеспечивают высокую (до 90%) эффективность миграции энергии, коэффициенты усиления флуоресценции акцепторов при этом достигают 4–5 единиц [3,4].

Целью настоящей работы было исследование механизмов переноса энергии от КТ к водорастворимым порфиринам. Нами было показано, что квантовые точки и порфирины способны образовывать гибридные комплексы с эффективным переносом энергии. Перенос энергии от КТ позволяет значительно повысить поглощающую способность порфиринов в ультрафиолетовой и видимых областях спектра. В работе использовали отрицательно заряженные квантовые точки двух типов: CdSe/ZnS покрытые оболочкой и CdTe без оболочки, а так же два вида порфиринов: отрицательно заряженный TPPS4 и положительно заряженный TMRuP.

Для исследования миграции энергии записывались спектры стационарной флуоресценции, а так же измерялись характерные времена затухания флуоресценции, что, согласно теории Штерна-Фолмера позволяет различить статическое и динамическое тушение. Исходя из полученных значений констант динамического тушения были сделаны расчеты эффективного расстояния между донором и акцептором, согласно теории Фёрстера.

1. Олейников В.А., Суханова А.В. Набиев И.Р., *Российские нанотехнологии*, 2007, 2(1–2), 160

2. Leatherade C.A., Woo W.K., Mikulec F.V., Bawendi M.G., *J. Phys. Chem. B*, 2002, 106, 7619

3. Nabiev I., Rakovich A., Sukhanova A., Lukashov E., Zagidullin V., Pachenko V., Rakovich Y.P., Donegan J.F., Rubin A.B., Govorov A.O., *Angew Chem Int Ed Eng*, 2010, 49(40), 7217

4. Максимов Е.Г., Гостев Т.С., Кузьминов Ф.И., Случанко Н.Н., Стадничук И.Н., Пащенко В.З., Рубин А.Б., *Российские нанотехнологии*, 2010, 5(№7-8), 107

**ОПТИМАЛЬНОЕ СОПРЯЖЕНИЕ СВЕТОСОБИРАЮЩИХ СУБАНТЕН
В СУПЕРАНТЕННЕ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ ЗЕЛЕННОЙ БАКТЕРИИ
CHLOROFLEXUS AURANTIACUS
Optimal interfacing of subantennae in superantenna of the green photosynthetic
bacterium *Chloroflexus aurantiacus***

**Анастасия ЗОБОВА, Андрей ЯКОВЛЕВ, Владимир НОВОДЕРЕЖКИН,
Александра ТАЙСОВА, Зоя ФЕТИСОВА**

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского
МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия;
E-mail: zoana@genebee.msu.su ; zfetisova@genebee.msu.su.

Настоящая работа продолжает цикл исследований стратегии эффективного функционирования природных светособирающих антенн в соответствии с нашей концепцией жесткой оптимизации структуры фотосинтезирующего аппарата по функциональному критерию [1]. Проведенные исследования позволили разработать модели оптимального сопряжения однородных субантенн в неоднородных суперантеннах, что обеспечивает высокую эффективность функционирования всей суперантенны в целом [2,3]. Целенаправленный поиск в суперантенне фотосинтезирующих зеленых бактерий *Chloroflexus (Cf.) aurantiacus* теоретически предсказанных структурных факторов, оптимизирующих функционирование этой суперантенны [2], позволил разработать модель ориентации диполей БХл *a*-субантенны Б798 базовой пластинки хлоросомы, оптимально сопрягающей экстремембранную хлоросомную БХл *c*-субантенну Б740 с мембранной БХл *a*-субантенной Б808-866, связанной с реакционными центрами *Cf. aurantiacus*. Модельные расчеты, проведенные для одиночной хлоросомы *Cf. aurantiacus*, показали, что в суперантенне *Cf. aurantiacus* оптимальное сопряжение однородных субантенн Б740, Б798 и Б808, достигающееся оптимизацией неизвестной ориентации диполей Q_y -переходов БХл *a* субантенны Б798, приводит к устойчивой минимизации времени переноса энергии Б740→Б798→Б808. Полученные данные соответствуют теоретической модели оптимальной одноосной ориентации БХл *a*-диполей, хаотично ориентированных вокруг нормали к мембране с углом наклона к плоскости мембраны $\phi_{opt} \approx 54^\circ$. Найденная теоретически модель оптимальной ориентации диполей Q_y -переходов молекул мономерного БХл *a* субантенны Б798 в суперантенне *Cf. aurantiacus* экспериментально подтверждена методом дифференциальной поляризационной абсорбционной спектроскопии с фемтосекундным разрешением. С помощью полученной нами теоретической зависимости стационарного значения параметра анизотропии поглощения от угла наклона диполей БХл *a* к плоскости мембраны при хаотичной ориентации этих диполей вокруг нормали к мембране было определено, что векторы дипольных моментов Q_y -переходов БХл *a* субантенны Б798, хаотично ориентированные вокруг нормали к мембране, образуют с плоскостью мембраны угол $\phi = 54,7^\circ$, то есть $35,3^\circ$ – с нормалью к мембране, что хорошо соответствует теоретически предсказанному оптимальному значению $\phi_{opt} \approx 54^\circ$.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ.

1. З.Г. Фетисова, М.В. Фок. Молек. Биол., 1984, 18, 1651-1656.
2. А.В. Зобова, А.Г.Яковлев, А.С.Тайсова, З. Г.Фетисова. Молек.Биол., 2009,43, 464-482.
3. А.В. Зобова, А.С. Тайсова, З.Г. Фетисова. Доклады Акад. Наук, 2010, 433, 122-125.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ВР-ЭПР ВОЗМОЖНОСТИ ПРЯМОГО ЗАСЕЛЕНИЯ ТРИПЛЕТНОГО СОСТОЯНИЯ В ИЗОЛИРОВАННЫХ КАРОТИНОИДАХ

Direct population of the triplet state of isolated carotenoids: TR-EPR investigation

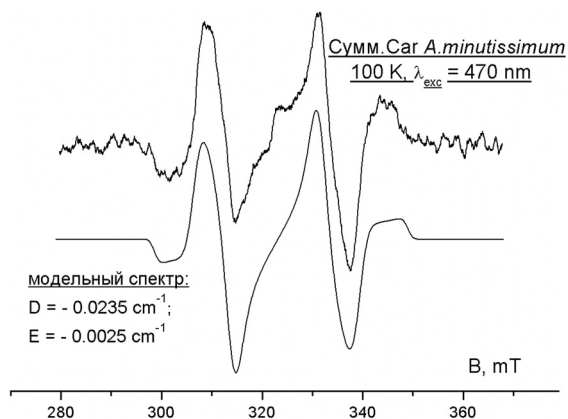
КЛЕНИНА И. Б., МАХНЕВА З. К., МОСКАЛЕНКО А. А., ПРОСКУРЯКОВ И. И.

Институт Фундаментальных Проблем Биологии РАН, Пущино,
Московская область, 142290, Россия
E-mail: kleonik@online.stack.net; Тел: +7-926-883-66-41

Неотъемлемыми элементами любой фотосинтетической системы являются реакционный центр (РЦ), где происходит первичное разделение зарядов, и светособирающая антенна, служащая для более эффективного сбора энергии света. Трансмембранные белки антенны содержат молекулы хлорофиллов и каротиноидов (Кар). Энергия поглощенного кванта передается по цепи этих пигментов в РЦ.

Прямое заселение триплетного состояния каротиноидов антенны представляется весьма маловероятным. При поглощении фотона, Кар переходит в возбужденное синглетное состояние, время жизни которого (1 ± 10 пс) слишком мало для протекания интеркомбинационной конверсии и, следовательно, образования триплетного состояния $^3\text{Кар}$.

Нами, методом ЭПР высокого временного разрешения, была проделана серия экспериментов по измерению фотоиндуцированных состояний различных каротиноидов, выделенных из антенного комплекса фототрофной бактерии *A. minutissimum*. Практически во всех образцах наблюдались (см. рисунок) характерные спектры ЭПР триплетного состояния, параметры которых позволили идентифицировать их как триплеты Кар.



По результатам анализа полученных спектров был сделан вывод о прямом заселении триплетных состояний каротиноидов по механизму синглет-триплетного деления возбуждения.

Авторы выражают благодарность фонду РФФИ (грант 09-04-00925) за финансовую поддержку.

ЭНЕРГИЯ СВЯЗИ ВОДЫ И ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА С МОЛЕКУЛОЙ ХЛОРОФИЛЛИДА, ЕГО ДИМЕРОМ И ТРИМЕРОМ

Energy of interaction of water and hydrogen peroxide with chlorophyllide molecule, its dimer and trimer

Геннадий КОМИССАРОВ¹, Антон ЛОБАНОВ¹, Николай СМИРНОВ²,
Геннадий СИНЬКО²

¹Учреждение Российской академии наук Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, 119991, Россия;
E-mail: komiss@cph.ras.ru; gkomiss@yandex.ru

²Российский федеральный ядерный центр Научно-исследовательский институт технической физики им. Е.И. Забабахина, Снежинск, 456770, Россия

Для протекания фотохимической реакции в гетерогенной системе (к таковой относится хлоропласт), необходимо предварительно связать (адсорбировать) субстрат реакции с пигментом. В концепции фотосинтеза, изложенной в [1], в качестве субстрата реакции, приводящей к выделению молекулярного кислорода и образованию протонов выступает не вода, а пероксид водорода (ПВ) экзо- и эндогенного происхождения. Для квантовохимических расчетов энергии связи как пероксида водорода, так и воды с пигментом, изменяющим свое агрегатное состояние (мономер, димер и тример) мы обратились к хлорофиллиду *a* (Хд), поскольку участие фитольного гидрофобного заместителя основного фотосинтетического пигмента хлорофилла в этом взаимодействии, как показали расчеты, несущественно. Расчеты были выполнены с использованием программы Gaussian 03 с набором базисных функций 6-31G** в DFT-приближении с применением обменно-корреляционного функционала PBE1PBE.

Наиболее предпочтительное место координации как молекулы ПВ, так и воды, расположено в окрестности центрального иона магния. Энергия связи при этом, как минимум на 40% больше по сравнению с иной локализацией. В случае мономерного Хд для ПВ она составляет 17,19 ккал/моль, для воды – 19,42 ккал/моль.

На основании расчетов были определены наиболее термодинамически устойчивые конфигурации димеров и тримеров Хд, для которых были рассчитаны энергии связи с водой и ПВ, помещенными либо внутрь ассоциата, либо с внешней стороны одного из макроциклов. В первом варианте координации энергетически выгоднее взаимодействие с ПВ, – на 2,6 ккал/моль, тогда как во втором случае энергетический выигрыш незначителен, – около 0,1 ккал/моль. Координация ПВ по внешнему положению тримера Хд предпочтительнее по сравнению со связыванием молекулы воды на 0,8 ккал/моль, а внутри тримера Хд – на 2,0 ккал/моль. Отметим, что связывание ПВ выгоднее и с менее стабильными ассоциатами Хд, в отдельных случаях на 4,0 ккал/моль.

Таким образом, степень ассоциации фотосинтетического пигмента существенна для связывания с ним молекул как ПВ, так и воды.

Работа выполнена при финансовой поддержке Международного научно-технического центра (проект 3910).

1. Комиссаров Г.Г. Фотосинтез: физико-химический подход. М.: Едиториал УРСС, 2003. 224 с.

ЭЛЕКТРОГЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ДОНОРНОЙ СТОРОНЕ ФОТОСИСТЕМЫ 2
Electrogenic reactions on the donor side of photosystem 2

КУРАШОВ В.Н., ПЕТРОВА И.О., МАМЕДОВ М.Д., СЕМЁНОВ А.Ю.

НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы 1, стр. 40, Россия
E-mail: vkurashov@yandex.ru, тел: +7 (495) 939-31-88

Одной из наиболее актуальных проблем в изучении функционирования фотосистемы 2 (ФС 2) является выяснение механизма переноса зарядов на донорном участке фермента, включающем кластер Mn_4Ca , его лигандное окружение и близлежащий тирозин Y_Z . Перспективным подходом в этих исследованиях является изучение механизма генерации трансмембранной разности электрических потенциалов ($\Delta\Psi$) комплексами ФС 2 в условиях однократного срабатывания фермента, что существенно облегчает интерпретацию наблюдаемых явлений по сравнению со стационарными процессами.

При добавлении экзогенного Mn^{2+} к препаратам ФС 2, лишенным марганцевого кластера было продемонстрировано наличие дополнительной электрогенной фазы, обусловленной восстановлением редокс-активного радикала тирозина (Y_Z^{\cdot}) от Mn . Обнаружено, что электрогенный характер восстановления тирозина Y_Z^{\cdot} не является специфичным для марганца, а имеет место и в случае искусственных доноров электронов, таких как 1,5-дифенилкарбазид, N,N,N' -тетраметил-*n*-фенилендиамин и 2,6-дихлорфенолиндофенол. Наблюдаемый электрогенез был приписан векторному переносу электрона от границы белок-вода к Y_Z^{\cdot} .

В случае низкомолекулярных искусственных доноров электронов, таких как гидроксиламин и гидразин, также наблюдалось восстановление редокс-активного радикала тирозина, однако дополнительная электрогенная стадия отсутствовала. Это позволило предположить, что подобные соединения могут диффундировать через каналы на донорной стороне белка к марганец-связывающему сайту с последующим восстановлением Y_Z^{\cdot} .

ПЕРВИЧНЫЙ ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНА В МУТАНТНЫХ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ *RHODOBACTER SPHAEROIDES* С ЗАМЕЩЕННЫМИ ЛИГАНДАМИ АТОМОВ МАГНИЯ МОНОМЕРНЫХ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛОВ

Primary electron transfer in *Rhodobacter sphaeroides* mutant reaction centers with substituted ligands to the Mg atoms of the monomer bacteriochlorophyll molecules

Мария ЛЕОНОВА, Людмила ВАСИЛЬЕВА, Антон ХМЕЛЬНИЦКИЙ, Равиль ХАТЫПОВ, Владимир ШУВАЛОВ

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Московская обл., 1422990, Россия;

E-mail: Leonova-mari@yandex.ru; Fax: 8(4967)330532

Фотосинтетический реакционный центр (РЦ) представляет собой трансмембранный пигмент-белковый комплекс, в котором протекает реакция преобразования световой энергии в энергию разделенных зарядов. РЦ пурпурной бактерии *Rhodobacter (Rba.) sphaeroides* состоит из трех белковых субъединиц и десяти кофакторов переноса электрона, в него также входят молекулы липидов и воды. Кофакторы образуют 2 псевдосимметричные ветви (А – активную, и В – неактивную). Перенос электрона представляет собой многоступенчатый процесс, на первом этапе которого происходит передача электрона от первичного донора, возбужденного димера БХл P^* , на первичный акцептор, мономерный БХл V_A , с образованием состояния с разделенными зарядами $P^+V_A^-$. Известно, что белковое окружение кофакторов оказывает значительное влияние на направление и скорости электронного транспорта. Аминокислотный остаток His L153 служит лигандом к атому Mg БХл V_A . В данной работе исследованы мутантные РЦ *Rba. sphaeroides*, в которых, в результате замещения данной аминокислоты, произошли значительные изменения в структуре и функциональной активности. Замена гистидина L153 на тирозин приводит к дестабилизации РЦ и к уходу из комплекса молекулы БХл V_A . И как следствие – к 14-ти кратному снижению квантового выхода образования состояния с разделенными зарядами $P^+Q_A^-$. Дополнительная мутация, замена гистидина M182 на лейцин, становится причиной появления БФео Φ_B в сайте связывания БХл V_B . Показано, что в РЦ с двойной мутацией электрон от первичного донора передается только на молекулу Φ_B неактивной цепи кофакторов, и образуется состояние с разделенными зарядами $P^+\Phi_B^-$, которое за времена порядка 180 пс рекомбинирует в основное состояние.

Работа была поддержана грантом РФФИ (09-04-00109-а), Программой Президиума РАН МКБ, Грантом Президента РФ № НШ 3201.2010.4 и Министерством образования и науки РФ (ГК №02.740.11.0293).

ЭЛЕКТРОГЕННЫЕ РЕАКЦИИ В КОМПЛЕКСАХ ФОТОСИСТЕМЫ 2
Electrogenic reactions in photosystem II complexes

М.Д. МАМЕДОВ, В.Н. КУРАШОВ, И.О. ПЕТРОВА, А.Ю. СЕМЕНОВ

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ
119992 Москва, Ленинские горы, Россия; email: mahirmamedov@yandex.ru

На протеолипосомах с помощью прямого электрометрического метода проведено систематическое исследование электрогенных реакций, связанных с переносом зарядов в комплексах фотосистемы 2 (ФС 2) из шпината. Показано, что основной вклад в генерацию трансмембранной разности электрических потенциалов обусловлен: (1) разделением зарядов между первичным донором электронов P680 и хинонным акцептором Q_A ; (2) восстановлением фотоокисленного P680 от редокс-активного аминокислотного остатка тирозина Y_Z ; (3) протонированием дважды восстановленного вторичного хинонного акцептора Q_B и (4) реакциями, обусловленными $S1 \rightarrow S2$, $S2 \rightarrow S3$ и $S3 \rightarrow S4 \rightarrow S0$ редокс-переходами комплекса окисления воды ФС 2.

Исследование быстрой кинетики генерации фотоэлектрического ответа в ядерных комплексах ФС 2, лишенных Mn_4Ca кластера и трёх периферических белков, в присутствии искусственных доноров электронов, а также синтетических трехъядерных марганцевых комплексов продемонстрировало появление дополнительной более медленной фазы генерации мембранного потенциала. Было заключено, что дополнительный электрогенез обусловлен векторным переносом электрона от границы белок-вода к фотоокисленному радикалу Y_Z .

**МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ
ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА В ФОТОСИСТЕМЕ I ЦИАНОБАКТЕРИЙ**
Molecular dynamic simulation of electron transfer in cyanobacterial Photosystem I

Георгий МИЛАНОВСКИЙ¹, Дмитрий ЧЕРЕПАНОВ², Алексей СЕМЕНОВ³

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ, Москва,

E-mail: milanovsky@gmail.com; тел.: +7-903-772-60-43

²Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва.

³НИИ Физико-химической биологии им А.Н. Белозерского МГУ, Москва.

Кофакторы реакционных центров фотосистем (ФС) 1 и 2, необходимые для осуществления переноса электрона, гомологичны друг другу, однако их среднеточечные редокс-потенциалы отличаются более чем на 700 мВ. Можно предполагать, что разница в их свойствах обусловлена белковым окружением, однако детали этой зависимости до сих пор неясны. Недавно было показано, что у мутантных штаммов цианобактерий *Synechocystis sp.* PCC 6803 с точечными заменами метионинов M688_{PsaA} и M688_{PsaB} на аспарагины (M688N_{PsaA} и M668N_{PsaB}, соответственно) в ФС 1 перенос электронов идет преимущественно по ветви А из двух симметричных ветвей редокс-кофакторов [1]; при этом скорость первичных стадий разделения зарядов существенно замедляется по сравнению с диким типом. С другой стороны, недавно было продемонстрировано, что перенос электронов между димером хлорофилла P₇₀₀ и первичным хлорофильным акцептором A₀ в ФС 1 из цианобактерии *Synechocystis sp.* PCC 6803 происходит за время короче 100 фс, т.е. в 10–100 раз быстрее, чем предполагалось ранее [2].

Для выяснения возможных механизмов, обуславливающих сверхбыстрое первичное разделение зарядов, выявления асимметрии этого процесса и влияния на него мутаций в ближайшем окружении хлорофилла A₀, на основании трехмерной структуры ФС 1 дикого типа *Synechococcus elongatus* и мутантов M688N_{PsaA} и M668N_{PsaB} впервые была построена полная молекулярно-динамическая модель, на которой симулировались процессы образования первичной (P700⁺A₀⁻) и вторичной (P700⁺A₁⁻) ион-радикальных пар. Было обнаружено, что внесение мутации M688N_{PsaA} повышает по сравнению с диким типом энергию реорганизации системы в процессе разделения зарядов по ветви А, что может повлечь за собой повышение энергии активации реакции переноса электрона и тем самым объяснить ее замедление, наблюдаемое экспериментально. Было также продемонстрировано, что перенос электрона по ветвям редокс-кофакторов А и В существенно неравнозначен энергетически.

Были построены осцилляционные спектры системы в незаряженном состоянии, а также на промежуточных стадиях переноса электрона, которые согласуются со спектрами, наблюдаемыми при сверхбыстрой спектроскопии, и могут быть использованы для построения количественной модели переноса электрона в ФС 1.

1. Savitsky A., Gupta O., Mamedov M., Golbeck J.H., Tikhonov A., Möbius K., Semenov A. Appl Magn Reson, 2010, 37, 85

2. Shelaev I.V., Gostev F.E., Mamedov M.D., Sarkisov O.M., Nadtoshenko V.A., Shuvalov V.A., Semenov A. Yu., Biochim. Biophys. Acta, 2010, 1797(8), 1410.

**ТРИПЛЕТНОЕ СОСТОЯНИЕ ХЛОРОФИЛЛА *d*: ФОСФОРЕЦЕНЦИЯ
И ГЕНЕРАЦИЯ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА**
Chlorophyll *d* triplet state: phosphorescence and generation of singlet oxygen

К. В. НЕВЕРОВ^{1,2}, С. САНТАБАРБАРА³, А.А. КРАСНОВСКИЙ^{1,2}

¹Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33
neverovk@mail.ru

²Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, 119992 Москва, Воробьевы Горы, д.1, стр.12.

³Институт биофизики, Национальный Совет Научных Исследований, 20133, у. Челория 26, Милан, Италия

Хлорофилл *d* (Хл *d*) – основной фотосинтетический пигмент антенных комплексов у одноклеточной цианобактерии *Acariochloris marina*. Хл *d* обнаружен также в реакционных центрах (РЦ) фотосистем 1 и 2 у этого организма, что указывает на особенности первичных фотосинтетических процессов в РЦ подобного типа. В то время, как фотофизические свойства Хл *a* в настоящее время хорошо изучены, многие фотофизические параметры Хл *d*, существенные для его фотохимической активности, ещё недостаточно исследованы.

В данной работе мы изучали триплетное состояние Хл *d*, которое заселяется в результате конверсии из синглетно-возбужденного состояния. Впервые была зарегистрирована и исследована низкотемпературная (77 К) фосфоресценция, сопровождающая излучательную дезактивацию триплетно-возбужденных молекул Хл *d*. Были получены данные об энергии триплетного состояния и его времени жизни в замороженных эфирных и водно-детергентных (2% Тритон X 100) растворах Хл *d*. Главный максимум фосфоресценции при 77 К находился при 978 нм (полуширина пика 67 нм), что соответствует величине энергетического уровня триплетного состояния в 1,26 eV.

Нами было показано, что при комнатной температуре при освещении растворов Хл *d* также происходит эффективное заселение его триплетного состояния, что в аэробных условиях приводит к образованию синглетного молекулярного кислорода. Квантовый выход фотосенсибилизированной Хл *d* генерации синглетного кислорода составил в гексафторбензоле 65%. Это значение близко тем, что были получены ранее для Хл *a* и феофитина *a* в органических водно-детергентных средах, что позволяет предположить возможность активного участия триплетных молекул Хл *d* в фотоокислительных процессах, являющихся причиной фотоингибирования фотосинтетического аппарата у Хл *d*-содержащих организмов.

**РЕКОНСТРУКЦИЯ КОМПЛЕКСА ОКИСЛЕНИЯ ВОДЫ В ЯДЕРНЫХ
КОМПЛЕКСАХ ФОТОСИСТЕМЫ 2, ЛИШЕННЫХ МАРГАНЦА, *IN VITRO***
*In vitro reconstruction of the water-oxidizing complex in manganese-depleted core
complexes of Photosystem 2*

И.О. ПЕТРОВА, В.Н. КУРАШОВ, А.Ю. СЕМЕНОВ, М.Д. МАМЕДОВ

119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы МГУ 1, НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского
E-mail: iopetrova17@gmail.com, Тел.: 89060725909

С помощью метода измерения переменной флуоресценции было исследовано функционирование ядерных комплексов фотосистемы 2 из шпината в растворе и в липосомах. Липидные везикулы готовились из фосфолипидов сои (азолектин) или смеси липидов тилакоидов шпината. По сравнению с интактными ядерными комплексами ФС 2, демонстрирующими две различные фазы флуоресценции, обозначаемые O-J и J-P, в случае препаратов, лишенных марганца в растворе и в протеолипосомах, наблюдалось полное подавление J-P фазы. Возрастание фазы J-P в присутствии экзогенного $MnCl_2$ (4 Мп/РС) свидетельствует о частичном восстановлении кислород-выделяющей активности ФС 2. Фаза J-P, наблюдавшаяся в растворе, имела характерное время ~320 мс, а в препаратах ФС 2, встроенных в липосомы, эта фаза ускорялась до ~20 мс в случае азолектина и до ~9 мс в случае смеси тилакоидных липидов. Эти данные показывают, что липидное окружение увеличивает относительную скорость выделения кислорода. Отметим, что скорость выделения кислорода в образцах ФС 2 в растворе и в протеолипосомах составляла 60% и 70% по отношению к интактной ФС 2, соответственно. По-видимому, стимулирующее действие липидов на реконструкцию комплекса окисления воды основано на поддержании оптимальной структуры белка ФС 2.

**ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН K223E И K226E В БЕЛКЕ PsbO
ФОТОСИСТЕМЫ 2 НА СТАБИЛЬНОСТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ
АКТИВНОСТЬ ВОДООКИСЛЯЮЩЕГО КОМПЛЕКСА
В КЛЕТКАХ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*
Effect of K223E and K226E amino acid substitutions in PsbO protein of the
Photosystem II on the stability and functional activity of the water-oxidizing complex
in *Chlamydomonas reinhardtii***

Алексей ПИГОЛЕВ, Дмитрий ТИМОШЕВСКИЙ, Вячеслав КЛИМОВ

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пушкино, Московская область,
142290, Россия;
E-mail: alexey-pigolev@rambler.ru

Основная роль белка PsbO в процессе окисления воды заключается в стабилизации Mn-кластера. Расположенный на донорной стороне ФС-2, PsbO закрывает неорганическое ядро водоокисляющего комплекса (ВОК) и ограничивает сайт окисления воды от внутритилакоидного пространства. В силу своего положения PsbO может регулировать доступ таких кофакторов как хлор, кальций, бикарбонат к ВОК и обеспечивать их удержание рядом с Mn-кластером. Кроме того, PsbO может участвовать в отведении протонов из зоны реакции, формируя канал для удаления H^+ . Анализ структуры белка позволяет выделить ряд аминокислотных остатков, которые могут формировать гидрофильный канал, соединяющий люмен и ВОК. На люменальной стороне, в его формировании может принимать участие остаток Lys 223 и 226 последовательности LGAQPPK. Чтобы проверить данное предположение на основе клеток штамма *ΔpsbO Chlamydomonas reinhardtii* были созданы мутанты водорослей с заменой лизина на глутаминовую кислоту – K223E и K226E. Выявлено, что смена заряда в результате мутации K226E приводит к нарушению стабильности белка и развитию *ΔpsbO* фенотипа (отсутствие фотоавтотрофного роста и фотосинтетической активности ФС-2). В случае с K223E экспрессия белка нарушена не была. Клетки мутанта K223E были способны к фотоавтотрофному росту и фотосинтетическому выделению кислорода. Однако, в сравнении с контролем скорость выделения кислорода и отношение F_v/F_m (характеризующего эффективность преобразования энергии в ФС-2) были снижены на 15–20 %. Также было увеличено время темновой релаксации переменной флуоресценции (F_v) в присутствии диурона, что указывает на нарушение в работе водоокисляющего комплекса (ВОК). В целом, исследование показывает важность аминокислотных остатков K223 и K226, расположенных на люменальной поверхности белка PsbO, для активности ВОК.

РАДИКАЛЬНЫЕ ПАРЫ И ТРИПЛЕТЫ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ И СВЕТСОБИРАЮЩИХ СИСТЕМ

Radical pairs and triplets of reaction centers and light-harvesting antennae

И.И. ПРОСКУРЯКОВ

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Московская область,
142290, Россия;

E-mail: pros@issp.serpukhov.su; Tel.: +8-4967-732880

В процессах передачи энергии в светособирающих антеннах и фотоиндуцированного переноса электрона в реакционных центрах фотосинтеза образуются и исчезают парамагнитные состояния молекул. Времена жизни таких состояний перекрывают по крайней мере 14 порядков, от 10^{13} с до 10 с. Интервал 10^7 – 10^3 с доступен для изучения с помощью метода ЭПР высокого временного разрешения (ВР-ЭПР). В докладе будет представлен обзор собственных и литературных данных по исследованию первичных процессов фотосинтеза указанным методом.

Возможности ВР-ЭПР иллюстрирует регистрация сигналов радикальной пары $[P^+I^-]$ бактериальных реакционных центров, время жизни которой в условиях ЭПР эксперимента составляет около 30 нс. Спектральные свойства РП дают информацию о взаимодействиях составляющих ее молекул. Более простой объект исследования – это радикальная пара $[P^+Q_A^-]$, время рекомбинации которой около 30 мс. Изучение ее спектров также дает информацию о взаимодействиях партнеров РП. Кроме того, с использованием возбуждения линейно-поляризованным светом (создание условий магнетофотоселекции) удается получить информацию о структурной организации этой радикальной пары. Данное обстоятельство имеет достаточно принципиальное значение, поскольку позволяет подтвердить рентгеноструктурные данные об ориентации молекулы Q_A в бактериальных реакционных центрах.

Триплетные состояния хлорофилльных пигментов в процессе фотосинтеза возникают в процессах, приводящих к потерям энергии. Тем не менее, локализуясь на молекулах, участвующих в переносе энергии и электронов, они несут информацию о взаимодействиях этих молекул, их природе и, в конечном счете, о механизмах первичных процессов. Метод ВР-ЭПР играет в исследовании триплетных состояний особую роль. Кроме данных о природе молекул-носителей триплетов он в ряде случаев позволяет получить сведения о механизме заселения триплетного состояния. В докладе будет рассказано о результатах изучения триплетных состояний бактериальных реакционных центров, как в условиях прерванного переноса электрона, так и при нормальном функционировании электронного транспорта. Будут приведены данные по изучению триплетных состояний РЦ фотосистемы 2, где генерация триплетов хлорофилла подавляется даже в условиях прерывания переноса электрона. Генерация данных состояний в фотосистеме 2 особенно нежелательна из-за высокой вероятности дальнейшего переноса энергии на молекулу кислорода с образованием синглетно-возбужденного кислорода. Будут также обсуждаться последние данные о прямом заселении триплетных состояний каротиноидов в светособирающих комплексах некоторых пурпурных бактерий – процесса, до последнего времени считавшегося запрещенным по спину.

Работа было поддержана грантами РФФИ 02-04-48850а, 05-04-49129а, 09-04-00925а.

**АСИММЕТРИЯ ПЕРВИЧНЫХ СТАДИЙ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ
В КОМПЛЕКСАХ ФОТОСИСТЕМЫ 1 ИЗ ЦИАНОБАКТЕРИЙ
*SYNECHOCYSTIS SP. PCC 6803***

Asymmetry of the primary stages of electron transfer in Photosystem I complexes from cyanobacteria *Synechocystis sp.* PCC 6803

Алексей СЕМЕНОВ¹, Иван ШЕЛАЕВ², Федор ГОСТЕВ², Махир МАМЕДОВ¹,
Олег САРКИСОВ², Владимир ШУВАЛОВ¹, Джон ГОЛЬБЕК³, Виктор НАДТОЧЕНКО²

¹НИИ физико-химической биологии им А.Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия
E-mail: semenov@genebee.msu.ru ; тел.: 495-939-3188

²Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия

³The Pennsylvania State University, University Park, PA, USA.

С помощью импульсной фемтосекундной спектроскопии исследован вопрос о степени асимметрии переноса электрона по ветвям редокс-кофакторов в реакционных центрах (РЦ) фотосистемы (ФС) 1. С этой целью во временном диапазоне от 20 фс до 200 пс было проведено сравнительное исследование дифференциальных кинетических спектров комплексов ФС 1, выделенных из цианобактерий *Synechocystis sp.* PCC 6803 дикого типа и из мутантных штаммов с точечными заменами аксиальных лигандов к первичному акцептору A_0 (метионин M688_{PsaA} и M688_{PsaB} на лейцины в каждой из симметричных ветвей кофакторов *A* и *B*, обозначаемых далее как AML и BML).

Рассмотрение дифференциальных спектров при различных временных задержках относительно возбуждающего импульса показало, что структура Q_y -полосы в комплексах ФС 1, выделенных из цианобактерий дикого типа и из мутанта BML имеет близкий мотив – на субпикосекундных временах наблюдается дублет двух пиков выцветания. Положение этих пиков совпадает с пиками поглощения первичного донора P700 (около 703 нм) и первичного акцептора электронов A_0 (около 690 нм). Ранее такая спектральная особенность была приписана нами сверхбыстрому (<100 фс) образованию возбужденного состояния $P700^+$ и первичному разделению зарядов с образованием ион-радикальной пары $P700^+A_0^-$ [1]. Исчезновение спектральных особенностей, характерных для A_0^- , связанное с переходом $P700^+A_0^- \rightarrow P700^+A_0A_1^-$, происходило с характерным временем ~30 пс.

В то же время в случае мутанта AML спектры ФС 1 существенно отличались как от спектров ФС 1 дикого типа, так и от спектров ФС 1 BML. Отсутствие дублета при ранних задержках (<5 пс) показывает, что экситон, образующийся в РЦ ФС 1 не приводит ни к образованию возбужденной формы первичного донора электронов $P700^*$, ни к переносу электрона от $P700^*$ на первичный акцептор A_0 с образованием пары $P700^+A_0^-$. Слабые признаки появления дублета в полосе выцветания появляются только на временах >10 пс. Спектр, характерный для образования вторичной радикальной пары $P700^+A_1^-$, наблюдается только при временных задержках >200 пс.

Полученные данные показывают, что аналогичные мутации по аксиальным лигандам к первичному акцептору A_0 в симметричных ветвях редокс-кофакторов *A* и *B* неравнозначны. Таким образом, можно заключить, что перенос электронов в ФС 1 цианобактерии *Synechocystis sp.* PCC 6803 происходит преимущественно по цепи *A*.

1. Shelaev I.V., Gostev F.E., Mamedov M.D., Sarkisov O.M., Nadtochenko V.A., Shuvalov V.A., Semenov A.Yu., Biochim. Biophys. Acta, 2010, 1797, 1410.

ПОЛОСЫ ПЕРЕНОСА ЗАРЯДА В СПЕКТРАХ ПОГЛОЩЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛОВ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С АКЦЕПТОРАМИ ЭЛЕКТРОНА *IN VITRO* И В ПРИРОДНОМ ФОТОСИНТЕЗЕ

The charge transfer bands in chlorophyll absorption spectra at interaction with electron acceptors *in vitro* and in natural photosynthesis

Юрий СТОЛОВИЦКИЙ

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино, Московская обл., Россия, тел.: (4967)73-37-18, Факс: (4967)33-05-32, E-mail: kosobr@rambler.ru

За последние годы в исследованиях структуры фотосинтетических реакционных центров (РЦ) и первичных фотореакций получены впечатляющие успехи [1]. Однако некоторые принципиально важные вопросы, в частности, поглощение с переносом заряда в хлорофилловых системах еще не выяснены окончательно, и для их решения используются различные подходы, в том числе физико-химическое моделирование [2].

В данном сообщении представлены результаты наших исследований комплексов с переносом заряда (КПЗ) природных (хлорофилл *a*, хлорофилл *b*, феофитин *a*, бактериохлорофилл *a*, бактериохлорофилл *c*) и синтетических (Zn-, Cd-, Fe-, Ni- феофитины, Mg – октаэтилпорфин, Zn - октаэтилхлорин) тетрапиррольных пигментов с тетрацианхинодиметаном (ТЦХ), тетрацианэтиленом (ТЦЭ) и другими акцепторами электрона, методами спектрофотометрии, флуориметрии, ЯМР. Рассмотрена также возможность протекания аналогичных процессов в природном фотосинтезе.

В растворах природных и синтетических тетрапиррольных пигментов (10^{-5} М) в хлороформе при введении акцепторов (ТЦХ, ТЦЭ; 10^{-3} М) и понижении температуры наблюдается образование КПЗ с появлением новых полос поглощения в области 1000–1500 нм. Положение полосы определяется выражением:

$$h\nu_{\text{ПЗ}} = \Phi_{1/2}^{\text{ox}} - \Phi_{1/2}^{\text{red}} - E_p \quad (1)$$

где: $\Phi_{1/2}^{\text{ox}}$ – потенциал окисления пигмента, $\Phi_{1/2}^{\text{red}}$ – потенциал восстановления акцептора, E_p – энергия поляризации среды вокруг диполя.

В соответствии с (1) развиваются представления о том, что длинноволновые полосы поглощения в димерах пигментов (экситонное поглощение) *in vitro* (димеры по Евстигнееву в неполярных высушенных растворителях; ковалентно связанные димеры хлорофилл/хлорофилл, ковалентно связанные димеры хлорофилл/феофитин) и в димерных структурах в природном фотосинтезе (Р700 в РЦ фотосистемы 1, Р680 в РЦ фотосистемы 2, специальные пары в бактериальных РЦ) являются полосами переноса заряда, где одна молекула пигмента служит донором, а другая акцептором электрона в зависимости от стереоконфигурации и условий окружения. Расчетное время переноса заряда (электрона), соответствующее полосам поглощения 680–700 нм и 1000–1500 нм, составляет 2–5 фемтосекунд. Не исключается также возможность образования в РЦ КПЗ большого радиуса (по Борисову) с вовлечением более двух сопряженных π -систем молекул пигментов.

1. T.J. Wydrzynski, K. Sato (Eds), *Advances in Photosynthesis and Respiration*. V. 22. Springer, Dordrecht, 2005.

2. Креславский В.Д., Садовникова Н.А., Оловянишникова Г.Д., Столовицкий Ю.М. Ж. физ. хим. 1993. Т. 67. С. 1059.

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ ОСНОВНЫХ КОМПОНЕНТОВ БАЗОВОЙ
ПЛАСТИНКИ ХЛОРОСОМНОЙ СВЕТОСОБИРАЮЩЕЙ АНТЕННЫ
ЗЕЛЕННЫХ АНОКСИГЕННЫХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ
СЕМЕЙСТВА *OSCILLOCHLORIDACEAE***

**Identification of main components of a baseplate of chlorosomal light-harvesting antenna
of green anoxygenic photosynthetic bacteria belonging to the family *Oscillochloridaceae***

**Александра ТАЙСОВА¹, Анастасия ЗОБОВА¹, Евгений ЛУКАШЕВ²,
Наталья ФЕДОРОВА¹, Людмила БАРАТОВА¹, Зоя ФЕТИСОВА¹**

¹НИИ физико-химической биологии им.А.Н. Белозерского,

²Биологический факультет, МГУ имени М.В.Ломоносова, 119991 Москва, Россия;

E-mail: taisova@genebee.msu.ru; Fax: +7-495-939-31-81;

Известно, что у зеленых фотосинтетических аноксигенных бактерий семейств *Chlorobiaceae* и *Chloroflexaceae* базовая пластинка хлоросом представляет собой пигмент-белковый комплекс, в котором белок CsmA связан с бактериохлорофиллом *a* (БХл *a*). В нашей работе проведено изучение пигмент-белкового состава базовой пластинки хлоросом у представителей третьего семейства зеленых бактерий *Oscillochloridaceae*. Для этих целей мы использовали низкотемпературную флуоресцентную спектроскопию и электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ПААГ с ДДС натрия) подвергнутых щелочной обработке и нативных хлоросом, выделенных из клеток *Oscillochloris trichoides*. Следует отметить, что наличие в хлоросомах *Osc. richoides* БХл *a* было подтверждено с помощью ВЭЖХ. Показано, что щелочная обработка хлоросом *Osc.trichoides* приводила к исчезновению полосы БХл *a* в спектрах флуоресценции хлоросом, регистрируемых при температуре 77 К, но не оказывала существенного влияния на спектральные характеристики главного пигмента хлоросом БХл *c* как в спектрах поглощения, так и в спектрах флуоресценции подвергнутых щелочной обработке хлоросом. Анализ содержания пигментов в подвергнутых щелочной обработке хлоросомах подтвердил отсутствие в них БХл *a*. Кроме того, показано, что из всех белков, обнаруживаемых в хлоросомах *Osc.trichoides* с помощью электрофореза в ПААГ с ДДС натрия, щелочная обработка хлоросом приводила к исчезновению только CsmA белка (5.7 kDa). Проведенные эксперименты продемонстрировали четкую корреляцию между CsmA белком и хлоросомным БХл *a*-компонентом, поскольку одновременное селективное исчезновение из хлоросом *Osc.trichoides* и БХл *a*-компонента, и белка CsmA возможно только в случае локализации обоих компонентов в периферийной структуре хлоросомы, т.е. вне БХл *c*-структуры, а, значит, внутри базовой пластинки хлоросомы. Сделан вывод, что в хлоросомах *Osc. trichoides* CsmA белок ассоциирован с БХл *a*, и оба указанных компонента локализованы в базовой пластинке хлоросомы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что антенна базовой пластинки хлоросом, представляющая из себя комплекс БХл *a* с ~6 kDa CsmA белком, является универсальным интерфейсом между БХл *c* субантенной хлоросомы и БХл *a* субантенной цитоплазматической мембраны у всех трех известных семейств зеленых аноксигенных фотосинтезирующих бактерий.

**ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ
Mn-БИКАРБОНАТНЫХ КОМПЛЕКСОВ С РЕАКЦИОННЫМИ ЦЕНТРАМИ
ТИПА II ИЗ АНОКСИГЕННЫХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ
Redox interaction of Mn-bicarbonate complexes with reaction centers type II from
anoxygenic photosynthetic bacteria**

**Василий ТЕРЕНТЬЕВ, Анатолий ШКУРОПАТОВ, Валентина ШКУРОПАТОВА,
Владимир ШУВАЛОВ, Вячеслав КЛИМОВ**

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино (Россия).
E-mail: v.v.terentyev@gmail.com, тел.: 8-916-842-17-39, факс: 8-496-733-05-32

Фотосинтетическое образование O_2 происходит в результате разложения H_2O в водоокисляющем комплексе фотосистемы 2, содержащем неорганическое ядро (Mn-кластер), вопрос о путях эволюционного происхождения которого до сих пор не решен. Было предположено, что бактериальные предшественники первых O_2 -выделяющих организмов (в Архейский период) могли использовать в качестве доноров электронов Mn²⁺-бикарбонатные комплексы $[Mn(HCO_3)_2]$, которые затем сформировали примитивный тетра-Mn-кластер на донорной стороне реакционного центра (РЦ) аноксигенных бактерий [1]. Исходя из этого, целью работы было изучить влияние $[Mn(HCO_3)_2]$ на кинетику темнового ревосстановления фотоокисленного первичного донора электрона (P⁺) РЦ типа II аноксигенных бактерий: *Rhodobacter sphaeroides* R-26, *Chromatium minutissimum* и *Chloroflexus aurantiacus*. О ревосстановлении P⁺ судили по уменьшению амплитуды полосы выцветания при 865 нм или поглощения при 790 нм (для *Ch. minutissimum*) дифференциального спектра поглощения «свет–темнота». В присутствии 0,5 мМ Mn²⁺ плюс 50 мМ HCO₃⁻ (pH 8,3), то есть при доминировании в растворе комплексов $[Mn(HCO_3)_2]$ с редокс-потенциалом (E_m) Mn²⁺ = 0,52 В [2], было показано увеличение скорости ревосстановления P⁺ ($E_m \approx 0,5$ В) *Rb. sphaeroides* (время полуспада $\tau_{1/2} \approx 100$ с) по сравнению с контролем, измеренным в отсутствие добавок ($\tau_{1/2} \approx 445$ с). Стимулирующий эффект пропал при добавлении Mn²⁺ ($E_m(Mn^{2+}_{aq}) = 1,18$ В) или HCO₃⁻ к РЦ отдельно друг от друга, а также при замещении Mn²⁺ на Mg²⁺ или Ca²⁺, или замещении бикарбоната на формиат, оксалат или ацетат, свидетельствуя о специфичности редокс-взаимодействия $[Mn(HCO_3)_2]$ с P⁺. В отличие от *Rb. sphaeroides*, добавление 0,5 мМ Mn²⁺ плюс 50 мМ HCO₃⁻ к РЦ из *Ch. minutissimum*, содержащих субъединицу цитохрома, затрудняющего взаимодействие Mn²⁺ с P⁺, или к РЦ *Cf. aurantiacus* с $E_m \approx 0,4$ В, не влияло на кинетику темнового ревосстановления P⁺. Полученные данные рассматриваются в качестве экспериментального подтверждения гипотезы о возможной ключевой роли Mn-бикарбонатных комплексов в эволюционном переходе от аноксигенного фотосинтеза к оксигенному.

1. Dismukes G. C., Klimov, V. V., Baranov, S. V., Kozlov, Y. N., Dasgupta, J., and Tyryshkin, A. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 98, 2170.

2. Kozlov Y.N., Zharmukhamedov S.K., Tikhonov K.G., Dasgupta J., Kazakova A.A., Dismukes G.C., and Klimov V.V. (2004) Phys. Chem. Chem. Phys, 6, 4905.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРВИЧНЫХ СОБЫТИЙ В ФОТОЦИКЛЕ
БАКТЕРИОРОДОПСИНЕ МЕТОДОМ ЭМИССИОННОЙ ИК-ФУРЬЕ
СПЕКТРОСКОПИИ.**

**Studies of the primary events in bacteriorhodopsin's photocycle
by FTIR- emission spectroscopy**

Евгений ТЕРПУГОВ, Ольга ДЕГТЯРЕВА

Институт биофизики клетки РАН РАН, Пущино, Московская область, 142290,
Россия;
E-mail: el_terpugov@rambler.ru; Fax: +7-096-73-305-09;

Бактериородопсин (БР), интегральный белок пурпурных мембран *Halobacterium salinarium* функционирует как светозависимая протонная помпа [1–3]. Ретиналь, связанный в центре белка поглощает свет и изомеризуется из *all-trans* в *13-cis*-конформацию. Серия конформационных изменений и перенос протона с последующим восстановлением структуры в *all-trans* конфигурацию сопровождается запасанием энергии в виде электрохимического потенциала. Механизм, посредством которого БР активируется вслед за поглощением кванта видимого света до сих пор остается все еще неизвестным. В частности, неизвестно когда и как первичные структурные и электронные изменения ретиналя запускают конформационные перестройки белка, которые впоследствии приводят к векторному переносу протона. Согласно основной гипотезе изменения белка происходят вследствие быстрой изомеризации ретиналя вокруг двойной С=С связи и изменения в опсине, вызванные перераспределением заряда в ретинале и его изомеризация запускаются независимо друг от друга, а их сопряжение осуществляется на более поздних стадиях фотоцикла. В то же время взаимодействия между отдельными колебательными модами ретиналя и опсина, в особенности на первичных стадиях фотоцикла из-за отсутствия соответствующей техники практически не изучены.

Ранее первичные процессы в бактериородопсине изучались в основном с использованием «rimpr-probe» техники с пико- и фемтосекундным временным разрешением, которые не дают прямой информации о структуре БР. Впервые информация о структуре колебательно-возбужденного ретиналя была получена методом КАРС с фемто- и пикосекундным временным разрешением [4]. Однако Раман спектроскопия, в том числе и КАРС не позволяют проводить наблюдение за изменениями в структуре белковой матрицы БР и не детектируют ретиналь-белковое взаимодействие.

Наше сообщение посвящено использованию разрабатываемого нами метода эмиссионной ИК-Фурье спектроскопии в изучении фотофизических процессов в БР. Демонстрируется возможность метода в определении структуры фотовозбужденного ретиналя и его взаимодействии с белковым окружением, а также в наблюдении каналов распространения колебательной энергии на первичных стадиях фотоцикла БР.

1. Oesterhelt D. and Stoekenius W., Nature, 1971, 233, 149
2. Lozier R. H., Bogomolni R. A., Stoekenius W., Biophys. J., 1975, 15, 955
3. Mathies R. A., Lin S. W., Ames J. B., Pollard W.T., Annu. Rev. Biophys. Chem., 1991, 20, 591
4. Atkinson G.H., Ujj L., Zhou Y., J.Phys. Chem. A., 200, 104, 4130

**ВЛИЯНИЕ НАПРАВЛЕННЫХ МУТАЦИЙ НА СТРУКТУРУ ДИМЕРА
БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА РЕАКЦИОННОГО ЦЕНТРА ПУРПУРНОЙ
БАКТЕРИИ *RHODOBACTER SPHAEROIDES***

**The effect of site directed mutations on the bacteriochlorophyll dimer structure in the
reaction center of purple bacteria *Rhodobacter sphaeroides***

**Татьяна ФУФИНА¹, Людмила ВАСИЛЬЕВА¹, Равиль ХАТЫПОВ¹,
Азат ГАБДУЛХАКОВ², Татьяна ХМЕЛЬНИЦКАЯ¹, Владимир ШУВАЛОВ¹**

¹Институт Фундаментальных Проблем Биологии РАН, Пушкино, ул. Институтская, 2,
Россия

²Институт Белка РАН, Пушкино, ул. Институтская, 4, Россия
E.mail: tat-fufina@yandex.ru

Фотосинтетические реакционные центры (РЦ) – это мембрансвязанные пигмент-белковые комплексы, в которых осуществляются первичные процессы преобразования световой энергии. РЦ пурпурной бактерии *Rba. sphaeroides* состоит из 10 кофакторов переноса электрона и трех белковых субъединиц (L, M, N). Кофакторы представлены димером бактериохлорофилла (БХл), который является первичным донором электрона (P), двумя молекулами мономерных БХл (В), двумя молекулами бактериофеофитина (БФео), двумя хинонами, молекулой каротиноида и атомом негемового железа. Отличительной особенностью РЦ является наличие двусторонней оси симметрии, относительно которой расположены активная (А) и неактивная (В) ветви переноса электронов. Белковые субъединицы не только представляют собой остов, поддерживающий компоненты РЦ в определенной ориентации, но и принимают непосредственное участие в процессе переноса электрона

Целью работы было исследование влияния аминокислотных замещений вблизи молекул первичного донора электрона на свойства РЦ *Rba. sphaeroides*.

Методом сайт-направленного мутагенеза были получены РЦ *Rba. sphaeroides* с аминокислотными замещениями I(L177)N, I(L177)N+H(L173)L, L(M196)N; L(M196)N+H(M202)L, I(M206)N+H(M202)L. Было отмечено, что в генетически модифицированных РЦ наиболее выраженные изменения спектральных и фотохимических свойств произошли в области поглощения молекул БХл специальной пары.

Была исследована стабильность структуры димера бактериохлорофилла. Установлено, что изменение положения лигандов атома магния молекул БХл Р может приводить к изменению положения молекул специальной пары относительно друг друга.

Для РЦ L(M196)N+H(M202)L и L(M196)N получены кристаллы и определена трехмерная структура комплекса с разрешением 3,2 и 3,1 Å, соответственно.

Работа проводилась при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям Российской Академии Наук, программы «Молекулярная и клеточная биология», гранта Президента Российской Федерации № НШ-3201.2010.4, РФФИ 09-04-00109-а. Кристаллографическая часть работы выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук и Программы «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН.

**ФЕМТОСЕКУНДНЫЕ ПРОЦЕССЫ РАЗДЕЛЕНИЯ ЗАРЯДОВ
В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ *Rba. SPHAEROIDES* С ИЗМЕНЕННЫМ
ПОТЕНЦИАЛОМ ПЕРВИЧНОГО ДОНОРА ЭЛЕКТРОНА**

**Processes of charge separation in reaction centers of *Rba. sphaeroides* with
altered midpoint potential of the primary electron donor on a femtosecond scale**

**Антон ХМЕЛЬНИЦКИЙ, Равиль ХАТЫПОВ, Антон ХРИСТИН, Мария ЛЕОНОВА,
Владимир ШУВАЛОВ**

Учреждение Российской академии наук Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Московская область, 142290, Россия;
E-mail: anhmel@mail.ru; Fax: +7(4967)33-05-32

Методом фемтосекундной спектроскопии исследованы процессы разделения зарядов в четырех различных мутантных реакционных центрах (РЦ) пурпурных бактерий *Rba. sphaeroides* с увеличенным окислительно-восстановительным потенциалом первичного донора электрона Р. Показано, что в РЦ мутанта с тремя аминокислотными заменами (M160LH/M197YH/L131LH) разделение зарядов отсутствует. В РЦ с одиночными заменами (M160LH, M197YH и L131LH) разделение зарядов происходит, но перенос электрона замедлен по сравнению с реакционными центрами дикого типа. Тем не менее, в дифференциальных спектрах РЦ данных мутантов наблюдается образование полосы поглощения анион-радикала мономерного бактериохлорофилла B_A^- за время затухания стимулированного излучения из P^* . Это позволяет сделать вывод о том, что в мутантных РЦ, также как в РЦ дикого типа, молекула B_A участвует в процессе переноса электрона на молекулу бактериофеофетина H_A в качестве непосредственного интермедиата.

Работа выполнена при финансовой поддержке, Министерства образования и науки Российской Федерации, Президиума РАН (программы «Молекулярная и клеточная биология» и «Нанотехнологии и наноматериалы»), Гранта Президента РФ, НШ-3201.2010.4.

**ФОТООБРАЗОВАНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ ПЕРОКСИДОВ НА ДОНОРНОЙ
СТОРОНЕ ФС2, НЕ СОДЕРЖАЩЕЙ ВОДООКИСЛЯЮЩЕГО КОМПЛЕКСА**
**Photoproduction of organic peroxides on the donor side of PS2 not containig
water-oxidizing complex**

**Андрей ХОРОБРЫХ¹, Сергей ХОРОБРЫХ^{1,2}, Денис ЯНЫКИН¹, Борис ИВАНОВ¹,
Вячеслав КЛИМОВ¹, Jun'ichi MANO²**

¹Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пушкино, Московской обл.,
142290, Россия

E-mail: andrewkhor@rambler.ru; Phone: (4967) 73-24-48; Fax: (4967)33-05-32

²Science Research Center, Yamaguchi University, Yoshida 1677-1, Yamaguchi 753-8515,
Japan

Было изучено фотообразование органических пероксидов в фотосистеме 2 (ФС2) при помощи флуоресцентной пробы Spu-HP. Два типа пероксидов, липофильные и относительно гидрофильные были определены исходя из скорости окисления Spu-HP. Добавление ионов двухвалентного железа, который разлагает пероксиды в реакции Фентона, к препаратам ФС2 после освещения приводило к почти полному исчезновению пероксидов, в то время как каталаза не влияла на уровень пероксидов. Эти результаты подтверждают, что соединения, образующиеся в безмарганцевых препаратах ФС2 представляют собой органические пероксиды. Фотообразование пероксидов было существенно выше в препаратах ФС2 лишенных марганца. Экзогенные доноры электрона (дифенилкарбазида или ферроцианида калия), а также диурон – ингибитор переноса электрона между Q_A и вторичным Q_B хинонными акцепторами, почти полностью подавляли фотообразование пероксидов когда были добавлены к препаратам ФС2 до освещения. Экзогенный акцептор электронов, феррицианид калия, подавлял фотообразование пероксидов на 10–20%. Эти данные согласуются с нашими предыдущими результатами о поглощении кислорода на донорной стороне ФС2 и указывают на то, что органические пероксиды образуются донорной стороне ФС2 в результате образования органических радикалов при нарушении донорования электронов к P680.

Освещение ($\lambda > 600$ нм, 1500 мкмоль фотонов $m^{-2} s^{-1}$) безмарганцевых перпаратов ФС2 в течении 3 минут приводило к образованию примерно 200 молекул пероксидов на один реакционный центр. Образование липофильных пероксидов насыщалось при интенсивности света 25 мкмоль фотонов $m^{-2} s^{-1}$, что указывает на высокую эффективность этого процесса. Пероксиды, образующиеся на донорной стороне ФС2, вероятно в том числе и несколько видов липидных пероксидов, могут участвовать в фотоингибировании ФС2, в частности, посредством модификации белков продуктами их распада, таких как малоновый диальдегид.

**ОБМЕН ХЛОРОФИЛЛОВ В ПРИРОДНЫХ ПИГМЕНТ-БЕЛКОВЫХ
КОМПЛЕКСАХ И НЕКОВАЛЕНТНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ
ХЛОРОФИЛЛОВ С БЕЛКАМИ**

**Chlorophyll exchange in natural pigment-protein complexes
and non-covalent association of chlorophylls with the proteins**

Михаил ХРИСТИН

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пушкино, Московская область,
142290, Россия;

E-mail: khristin_@rambler.ru, Fax: +7-096-77-331-34;

Проанализированы литературные данные экспериментов в которых показана возможность обмена экзогенно добавленных хлорофиллов к препаратам хлорофилл-белковых комплексов (ПБК) таких как ФС1, ФС2 и ЛН II. Сделан вывод и предположение о такой возможности не только в опытах с изолированными препаратами, но и в фотосинтезирующих организмах. Предполагается, что обмен возможен в условиях повреждения пигментов ферментными системами (хлорофиллазами, эстеразами) и фотохимическим окислительным стрессом, когда повреждение пигментов не затрагивает белковую часть комплексов преимущественно в условиях репарации комплексов.

Приводятся собственные данные, подтверждающие возможность обмена молекул хлорофилла в препаратах комплексов и показана ингибирующая роль каротиноидов в этом процессе на примере изолированного комплекса Д1-Д2-цит В559. После полной экстракции каротина из препаратов наблюдалось включение экзогенно добавленного бактериохлорофилла, либо обмен феофитинизированного хлорофилла на добавленный хлорофилл. Условия, такие как концентрация в среде детергентов, рН, ионная сила и природа буфера, способствовали интенсивности обмена. Приводятся данные, полученные модификацией препаратов глутаровым альдегидом и последующей экстракцией из них хлорофиллов. Обнаружено ингибирование экстракции органическими растворителями, мочевиной и детергентами и невозможность обмена хлорофиллов в таких препаратах. Такие комплексы плохо окрашивались белковым красителем Куммасси после их электрофореза в ПААГ, что могло быть следствием экранирования молекулами хлорофилла вакантных мест для красителя в структуре белков.

На основе собственных и литературных данных, предполагается, что генетические модификации белков путем замены аминокислот не способны создать условия для образования ковалентной связи хлорофиллов с белками. Кроме того, малая вероятность такой связи, подтверждается многочисленными мутациями с заменой аминокислот в процессе длительной эволюции фотосинтетических организмов. В случае образования такой связи из-за невозможности обмена поврежденных молекул хлорофилла на его нативные формы, организм вытеснялся отбором. Таким образом, проблема исследования феномена отсутствия ковалентной связи хлорофиллов с белками в природном фотосинтетическом аппарате становится особенно актуальной.

ФЕМТОСЕКУНДНАЯ ДИНАМИКА ПЕРВИЧНЫХ ПРОЦЕССОВ В ФОТОСИСТЕМЕ 1

Femtosecond dynamics of the primary processes in Photosystem 1

Иван ШЕЛАЕВ¹, Феодор ГОСТЕВ¹, Маир МАМЕДОВ², Виктор НАДТОЧЕНКО¹,
Олег САРКИСОВ¹, Алексей СЕМЕНОВ², Владимир ШУВАЛОВ³

¹Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, 119991, Россия;
E-mail: shelaev@bk.ru; Fax: +7(499)1378357

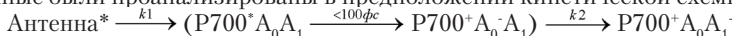
²Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва,
119991, Россия;

³Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Московская об-
ласть, 142290, Россия.

В последнее время процесс перенос электрона в фотосинтетическом комплексе фотосистема 1 (ФС1) изучается самым активным образом различными спектроскопическими методами, включая такой метод, как фемтосекундная абсорбционная спектроскопия. Однако, ранние стадии процесса переноса электрона в реакционном центре (РЦ) ФС1 крайне сложно выделить от мощного сигнала возбужденного антенного комплекса, который имеет место на тех же временах.

Фемтосекундные эксперименты были выполнены на установке, собранной в Институте химической физики РАН. Процессы разделения зарядов в ФС1 исследовались с помощью фемтосекундной абсорбционной спектроскопии методом «возбуждение-зондирование». При возбуждении импульсом длительностью 20 фс и несущей длиной волны 720 нм. преимущественно возбуждался первичный донор электрона – димер P700, находящийся в реакционном центре. Это позволило получить спектр первой ион-радикальной пары $P700^+A_0^-A_1$ (где A_0 – первичный *Chl* акцептор электрона, а A_1 – вторичный филохинонный акцептор) с полосами выцветания 690 и 705 нм на задержке в 100 фс.

Вычитание дифференциальных спектров поглощения ФС1 с закрытым РЦ (состояние $P700^+A_0A_1$) из дифференциальных спектров поглощения ФС1 с открытым РЦ (состояние $P700A_0A_1$) при тех же задержках позволило получить спектр первой ион-радикальной пары $P700^+A_0^-$ в чистом виде. Экспериментальные данные были проанализированы в предположении кинетической схемы:



Было обнаружено, что в условиях нашего эксперимента процесс переноса электрона в РЦ ФС1 имеет очень быструю компоненту (<100 фс), переход $P700^+A_0A_1$ в $P700^+A_0^-A_1$ примерно в половине РЦ, передачу энергии возбуждения от антенны *Chl** к $P700A_0A_1$ в остальных РЦ за время ~5 пс и образование второй ион-радикальной пары $P700^+A_0A_1^-$ к ~25 пс.

Быстрое разделение зарядов в РЦ ФС1 позволило выдвинуть гипотезу о когерентном механизме этого процесса, что было подтверждено рядом экспериментов с амплитудной модуляцией возбуждающего фемтосекундного импульса.

Кроме того, при исследовании вопроса об активности ветвей цепи переноса электрона в РЦ ФС1 с помощью мутантных штаммов ФС1 M688LPsaA (AML) и M688LPsaB (BML) было показано, что цепи переноса электрона не эквивалентны, и перенос происходит преимущественно по ветви А.

**АНГАРМОНИЧЕСКОЕ ДВИЖЕНИЕ ВОЛНОВОГО ПАКЕТА
ПРИ ФЕМТОСЕКУНДНОМ ВОЗБУЖДЕНИИ
РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ ФОТОСИНТЕЗА**
**Inharmonic motion of a wavepacket at femtosecond excitation of reaction centers
of photosynthesis**

Андрей **ЯКОВЛЕВ**¹, Владимир **ШУВАЛОВ**^{1,2}

¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия; E-mail: yakov@genebee.msu.su; Fax: 8-495-939-3181;

²Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Московская область, 142290, Россия; E-mail: shuvalov@issp.serpukhov.su

Исследование когерентных осцилляций вынужденного излучения первичного донора электрона, димера бактериохлорофилла в возбужденном состоянии P^* , в реакционных центрах бактерий методами фемтосекундной спектроскопии выявляет характерные частоты осцилляций в диапазоне $10\text{--}500\text{ см}^{-1}$ [1–3]. Для объяснения полученных данных проведено теоретическое моделирование движения волнового пакета ядер димера P в ангармонической потенциальной яме P^* . Расчеты показали, что центр тяжести волнового пакета $\langle x \rangle$ совершает сложное осциллирующее движение вдоль ангармонической потенциальной поверхности P^* . Спектр этого движения содержит ряд мод, частоты которых представляют собой разность частот соседних колебательных уровней P^* . Расчеты зависимости $\langle x \rangle(t)$ и ее Фурье-анализ проведены для различных параметров ангармонизма потенциала P^* . В простейшем случае гармонического потенциала P^* волновой пакет движется по гармоническому закону $\langle x \rangle(t) \sim \cos(\omega t)$, где ω – основная колебательная мода. Показано, что учет только одного параметра ангармонизма α в разложении колебательной энергии E_n приводит к периодическому распаду и восстановлению (частичному или полному) волнового пакета. В этом случае моды Фурье-спектра зависимости $\langle x \rangle(t)$ эквидистантны. Учет параметров ангармонизма более высокого порядка β и γ в разложении колебательной энергии E_n позволяет достичь лучшего соответствия Фурье-спектров осцилляций в эксперименте и расчетах. При учете β и γ моды в Фурье-спектре зависимости $\langle x \rangle(t)$ становятся неэквидистантными, а сама зависимость $\langle x \rangle(t)$ имеет вид квазихаотических осцилляций с определенной несущей частотой. Расчеты показывают, что Фурье-спектры экспериментальных осцилляций вынужденного излучения P^* соответствуют существенному ангармонизму потенциала P^* . Это согласуется с возбуждением достаточно высоких колебательных уровней в состоянии P^* при заметном смещении поверхностей P и P^* друг относительно друга. Таким образом, учет ангармонизма потенциальной поверхности P^* позволяет объяснить Фурье-спектры наблюдаемых в эксперименте осцилляций вынужденного излучения P^* .

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 11-04-00312).

1. Yakovlev A.G., Shkuropatov A.Ya., Shuvalov V.A., Biochemistry, 2002, 41, 14019.

2. Yakovlev A.G., Vasilieva L.G., Shkuropatov A.Ya., Bolgarina T.I., Shkuropatova V.A., Shuvalov V.A., J. Phys. Chem. A, 2003, 107, 8330.

3. Yakovlev A. G., Jones M.R., Potter J.A., Fyfe P.K., Vasilieva L.G., Shkuropatov A.Ya., Shuvalov V.A., Chem. Phys., 2005, 319, 297.

Секция 2

РЕГУЛЯЦІЯ ФОТОСИНТЕЗА

ДЕЙСТВИЕ УЗКОПОЛОСНОГО СВЕТА РАЗЛИЧНОГО СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА НА АДАПТАЦИЮ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА К СВЕТУ
The influence of narrow-band light with different spectra on the adaptation of the photosynthetic apparatus to light

**Ольга АВЕРЧЕВА¹, Василий ПТУШЕНКО², Екатерина БЫКОВА¹,
Елизавета БАССАРСКАЯ¹, Татьяна ЖИГАЛОВА¹**

¹Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет; 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12; Тел.: (495) 939-54-87; E-mail: olga.avercheva@gmail.com

²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва

Спектральный состав света – один из важнейших факторов регуляции формирования и работы фотосинтетического аппарата (ФСА). Современные источники освещения с узкополосным спектром испускания – светодиоды (СД) – дают возможность подробно исследовать действие различных спектральных полос на структуру и активность ФСА.

Растения салата (*Lactuca sativa* L.) выращивали в течение 27–30 суток при фотопериоде 16/8 ч и плотности потока квантов ФАР около $230 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Контрольные растения выращивали при освещении люминесцентными лампами (ЛЛ). В опытах использовали 2 варианта узкополосного освещения с обеднённым спектром: с использованием красных (660 нм) и синих (450 нм) СД и красных и синих СД с добавлением зелёных (535 нм). В обоих опытных вариантах в утренние и вечерние часы к освещению добавляли свет от дальних красных СД (750 нм). Работу ФСА исследовали, наблюдая за индукцией флуоресценции хлорофилла (Хл) адаптированных к темноте растений при их последующей адаптации к освещению.

У адаптированных к темноте растений квантовый выход разделения зарядов в фотосистеме II (Q_y) не различался и составил около 0,8. Однако спустя 1 минуту после начала освещения Q_y у растений, выращенных под ЛЛ, был выше, чем у растений, выращенных при освещении обеднённым спектром. Это указывает на относительно слабую (или замедленную) активацию ЭТЦ фотосинтеза у опытных растений по сравнению с контролем. Параметр NPQ , характеризующий нефотохимическое тушение флуоресценции Хл, не различался достоверно у растений, выращенных при разных вариантах освещения с обеднённым спектром, и при этом был выше, чем в контроле. Параметр qP , характеризующий фотохимическое тушение флуоресценции Хл, вёл себя по-разному в зависимости от уровня освещения, при котором проводилось измерение. При уровне $100 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ этот параметр не отличался у контрольных и опытных растений, а при уровне $150 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ – спустя минуту после начала освещения был выше у контрольных растений. Полученные данные указывают на то, что выращивание растений при освещении с обеднённым спектром приводит к изменениям в работе ФСА. У этих растений снижается (или существенно замедляется) активация ЭТЦ фотосинтеза при освещении, изменяется работа механизмов фотохимического и нефотохимического тушения флуоресценции Хл. Добавление в спектр относительно слабой (16% от общего потока квантов) зелёной полосы, по-видимому, не оказывает существенного влияния на формирование и работу ФСА.

**ДИССИПАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ ФС2
В УСЛОВИЯХ НЕДОСТАТКА ЭЛЕМЕНТОВ МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ**
Energy dissipation processes in PS 2 reaction centers under nutrient starvation

Тарас АНТАД¹, Алена ВОЛГУШЕВА^{1,2}

¹Биологический факультет МГУ, Ленинские горы, корп. 12, Москва, 119991, Россия; E-mail: taras@biophys.msu.ru; Fax: +7-495-939-11-15;

²Photochemistry and Molecular Science Dept, Uppsala university, SE-751 05, Uppsala, Sweden

Специфические изменения редокс-потенциалов хиноновых акцепторов в ФС 2, предположительно, играют важную фотозащитную роль наряду с другими механизмами диссипации избыточной энергии, которая не может быть использована в реакциях фотосинтеза (1). В настоящей работе исследовали изменения на акцепторной стороне ФС 2 в листьях проростков бобов *Phaseolus vulgaris* и клетках зеленых водорослей *Chlamydomonas reinhardtii* в условиях недостатка важных компонентов минерального питания: азота и серы. Для этого измеряли и анализировали кинетические кривые темнового затухания флуоресценции хлорофилла (кинетики реокисления Qa[•]) и кривые термолуминесценции в клетках водорослей и в тилакоидных мембранах, выделенных из листьев растений. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в водорослях голодание индуцирует переход хинонов Qa в высокопотенциальную, а Qb – в низкопотенциальную форму, в то время как в растениях изменения касались только редокс потенциала Qb, величина которого заметно снижалась. Ранее аналогичные изменения редокс потенциалов Qa и/или Qb наблюдали в ФС 2 растений, культивируемых в условиях низких температур или дефицита воды. Эти природные стрессы, также как и дефицит азота или серы, приводят к нарушению цикла Кальвина и снижению линейного транспорта электронов в хлоропласте. Результаты данной работы и имеющиеся в литературе данные позволяют сделать вывод о том, что любые воздействия, нарушающие баланс между фотосинтетическим транспортом электронов в тилакоидных мембранах и процессом фиксации CO₂, индуцируют специфические изменения свойств Qa и/или Qb, способствуя диссипации энергии в реакционных центрах ФС 2. Возможным запускающим механизмом изменений редокс потенциалов переносчиков на акцепторной стороне ФС 2 является редокс состояние пластохинонового пула.

1. Ivanov A., Sane P., Hurry V., Oquist G., Huner N., *Photosynth Res.*, 2008, 98, 565

**ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КАК ИНДИКАТОР
ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ЛИСТЬЕВ ЗЕМЛЯНИКИ
RED GAUNTLET, ЗАРАЖЕННОЙ ПАУТИННЫМ КЛЕЩОМ
TETRANYCHUS ATLANTICUS MCGREGOR**

Photosynthetic fluorescence parameters of *Red gauntlet* strawberry leaves infested with *Tetranychus atlanticus* McGregor as reliable indicators of plant physiological state

Алексей БАЙКОВ¹, Алена КВИТКА², Сергей ПОПОВ², Михаил СОЛНЦЕВ³,
Александр ТИХОНОВ³

¹ВНИИ селекции и семеноводства овощных культур, п. ВНИИССОК, Московская область, 143080, Россия, e-mail: a.baikov@list.ru; тел.: +7-906-702-79-59

²Агрономический факультет РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, 127550, Россия

³Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия

Методами РАМ-флуориметрии и термолюминесценции (ТЛ) изучен фотосинтетический транспорт электронов в листьях садовой земляники в норме и у растений, подвергшихся повреждению паутинным клещом. Показано, что на начальных стадиях повреждения растений спектр флуоресценции не изменяется (отношение максимумов равно $I_{686}/I_{740} = 0,75-0,76$). Это свидетельствует о том, что содержание хлорофилла в листьях контрольных и опытных («поврежденных») растений практически не меняется [1]. Квазистационарные значения нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла (NPQ) и фотосинтетической активности фотосистемы 2 ($\Phi_{\text{Фс2}}$) у контрольных и опытных растений практически совпадают. Показано также, что на ранних стадиях повреждения у опытных растений не происходит достоверных изменений светосуммы полосы ТЛ в интервале температур 0÷45°С. Эти результаты свидетельствуют о том, что фотохимическая активность фотосинтетического аппарата у опытных растений сохраняется такой же, как у контрольных растений. С другой стороны, кинетические характеристики флуоресценции хлорофилла у контрольных и опытных образцов различаются. Наблюдалось увеличение максимального уровня флуоресценции хлорофилла F_m поврежденных листьев по сравнению с контролем. Рост NPQ в опытных растениях развивается медленнее, а в темноте NPQ релаксирует быстрее по сравнению с контролем, что можно объяснить слабым разобщающим действием клещевого повреждения на тилакоидные мембраны. Это предположение согласуется с результатами исследований методом ТЛ. У опытных образцов увеличивается светосумма высокотемпературной полосы (55÷100°С), что может свидетельствовать, согласно [2, 3], о частичной деградации мембранных липидов при повреждении листьев клещом. При этом снижается суммарное содержание антиоксидантов в опытных образцах, что также может свидетельствовать о деградации мембранных липидов в результате окислительного стресса. Таким образом, флуоресцентные методы позволяют детектировать нарушения фотосинтетического аппарата на ранних стадиях повреждения растений, до того, как симптомы повреждения наблюдаются визуально.

1. Buschmann C., *Photosynth. Res.*, 2007, 92, 261

2. Stallaert V.M., Ducruet J.M., Tavernier E., Blein J.P., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1229, 290

3. Солнцев М.К., *Биофизика*, 1995, 40(2), 417

**АКТИВНОСТЬ ФС I и ФС II ХЛОРОПЛАСТОВ РАЗЛИЧНЫХ РАСТЕНИЙ
ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ**
Activity of PS I and PS II of chloroplasts of different plants under the ionizing irradiation

Кенуль БАЙРАМОВА

Институт ботаники НАН Азербайджана, Баку AZ 1073, Азербайджан;
E-mail: bayramova_k@yahoo.com; Тел: (994-12) 438 1164; Факс: (994-12) 510 2433

Изучение влияния антропогенных факторов на растительность - одна из наиболее важных составляющих проблем глобальности экологических процессов. Нефть и нефтепродукты относятся к наиболее распространенным и вредоносным факторам окружающей среды, вызывающим существенные изменения в функционировании растений. В работе исследованы структурно-функциональные изменения в растениях, произрастающих в условиях с повышенным и естественным радиационным фоном на территории завода (бывшего) по производству йода, расположенного в посёлке Раманы, а также на близлежащих территориях. В качестве объектов исследования были выбраны парнолистник обыкновенный (*Zygophyllum fabago*) и камыш (*Scirpus* L.). Растения, подвергнутые стрессу, были собраны с участков, где радиационный фон был самым высоким (200 $\mu\text{P}/\text{час}$). На этой территории были отобраны также и контрольные растения, однако в соответствии с показаниями измерений дозиметра уровень радиации на участках отбора контрольных образцов камыша составлял всего 8 $\mu\text{P}/\text{час}$, а для контрольного варианта парнолистника обыкновенного - 4-5 $\mu\text{P}/\text{час}$. Из растений, произрастающих в условиях с нормальным радиационным фоном, а также растений, живущих под действием радиации с дозой излучения 200 $\mu\text{P}/\text{час}$, были выделены хлоропласты и проанализированы активности фотосистемы (ФС) I и ФС II. У камыша, по сравнению с контролем, в стрессовых условиях фотохимическая активность ФС I повысилась на 200% (контроль - 80 $\mu\text{моль O}_2 \text{ мг}^{-1} \text{ Хл ч}^{-1}$, стресс - 240 $\mu\text{моль O}_2 \text{ мг}^{-1} \text{ Хл ч}^{-1}$), а фотохимическая активность ФС II повысилась на 400% (контроль - 12 $\mu\text{моль O}_2 \text{ мг}^{-1} \text{ Хл ч}^{-1}$, стресс - 60 $\mu\text{моль O}_2 \text{ мг}^{-1} \text{ Хл ч}^{-1}$). В случае же с парнолистником, фотохимическая активность ФС I возрастает на 33%, а ФС II - на 50% под действием излучения. Полученные результаты обсуждаются.

ВЛИЯНИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА ФОТОСИНТЕЗ РАСТЕНИЙ ЧАЯ Influence of microelements on photosynthesis of tea plants

Оксана БЕЛОУС

ГНУ ВНИИ ЦиСК Россельхозакадемии, Сочи, ул. Я. Фабрициуса, 354207, Россия;
E-mail: Oksana191962@rambler.ru; +7-918-105-91-15

Растения чая обладают потенциальной продуктивностью фотосинтеза в пределах от средней до высокой. В благоприятных условиях растение может ассимилировать до 20 мг $\text{CO}_2/\text{дм}^2$ в час. И как показано нашими исследованиями существенное влияние на этот процесс оказывают микроэлементы.

В пасмурный день, когда максимальная освещенность не превышала 18 тыс. люкс, а температура находилась в пределах 18–19°C, фотосинтез во второй половине дня (с 14 часов) не превышал 2,0–4,0 мг $\text{CO}_2/\text{дм}^2\text{час}$. Низкие значения интенсивности фотосинтеза в этот период объясняются действием неблагоприятного водного режима, создавшегося в результате продолжительной засухи (около 6 недель). У чайного растения процесс фотосинтеза протекает очень динамично. В течение светового дня интенсивность фотосинтеза постоянно меняется и имеет «пульсирующий» характер, когда в продолжение даже одного часа при благоприятных погодных условиях усвоения CO_2 листьями достигает максимальных значений, а затем резко снижается вплоть до полного прекращения процесса и даже выделения углекислоты в результате активного дыхания. Особенно активизирует фотосинтез некорневая подкормка растений марганцем, который, быстро проникая в клетки, способствует значительному увеличению интенсивности видимого фотосинтеза, вплоть до максимальных значений (около 20 мг $\text{CO}_2/\text{дм}^2\text{час}$). Одновременно наблюдается усиление дыхательной функции листа, причем, периоды интенсивного поглощения углекислоты довольно равномерно сменяется фазами, когда происходит выделение значительных количеств CO_2 в процессе светового дыхания. Причиной таких «пульсаций», по нашему мнению, является накопление в короткое время в хлоропластах большого количества первичных ассимилянтов в период энергичного возрастания интенсивности фотосинтеза и требуется определенное время для «переработки» и оттока метаболитов. В такие моменты интенсивности фотосинтеза резко снижается и начинает превалировать процесс светового дыхания.

На протяжении исследований мы сталкивались с тем обстоятельством, что на варианте с некорневой обработкой сернокислым железом растения чая испытывают некоторое угнетение жизнедеятельности, что подтверждается данными по водному режиму. Не являются исключением процессы фотосинтеза и дыхания листьев. Так, до 15 часов фотосинтез протекал вяло, интенсивность его составляла 3–5 мг $\text{CO}_2/\text{дм}^2\text{час}$, хотя освещенность и температура воздуха в это время были благоприятными. И только после 15 часов происходило повышение интенсивности фотосинтеза и фотодыхания листьев, продолжавшееся до конца светового дня, несмотря на снижение потока фотосинтетически активной радиации. В это время наблюдалось увеличение амплитуды и частоты «пульсации» кривой фотосинтеза. Однако суммарная продуктивность фотосинтеза на этом варианте, по-видимому, не могла обеспечить функционирования всех органов из-за недостатка энергетического материала, что и вызывает угнетение растений.

Таким образом, некорневые подкормки марганцем оказывают влияние на метаболизм клетки, в частности на процессы ассимиляции и диссимиляции веществ, что учитывая его роль в повышении стресс-устойчивости может служить надежным агротехническим приемом, повышающим продуктивность и адаптивные реакции растений чая.

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФОТОСИСТЕМ У МУТАНТОВ ЦИАНОБАКТЕРИИ *SYNECHOCYSTIS* SP. PCC 6803, ЛИШЕННЫХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ

Regulation of photosystems activity in cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 mutants deficient in respiratory hydrogenases

Юлия БОЛЫЧЕВЦЕВА¹, Ирина ЕЛАНСКАЯ², Навасард КАРАПЕТЯН¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071 Москва, Ленинский пр., 33; факс: (495)954-2732, E-mail: bolychev@inbi.ras.ru;

²Кафедра генетики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Воробьевы Горы

Исследовали циклический перенос электрона вокруг фотосистемы 1 (ФС1) и активность ФС2 в клетках дикого типа цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 и мутантов, лишенных дегидрогеназы NDH-1 (M55) или сукцинатдегидрогеназы (SDH⁻). Фотоиндуцированные изменения поглощения P700 в присутствии диурона и индукцию флуоресценции измеряли при помощи импульсного флуориметра PAM101. Для регулирования уровня NADP⁺ в строме клетки выдерживали 30 мин на свету (25 $\mu\text{E m}^{-2} \text{c}^{-1}$) или 2 ч в темноте. Клетки дикого типа и мутантов, выдержанные 30 мин на свету, характеризуются одинаковой кинетикой переменной флуоресценции (F_v) в присутствии DCMU, тогда как клетки дикого типа и, особенно, мутанта M55, выдержанные в темноте, обнаруживают более низкую величину F_v по сравнению с клетками мутанта SDH⁻ даже в присутствии DCMU. Это может быть связано с переходом клеток дикого типа и мутанта M55 из состояния 2, в котором они находятся после 2 ч темноты, в состояние 1 после 30 мин освещения белым светом. Сравнение «редокс» состояния пула PQ у дикого типа и обоих мутантов, оцененное по отношению площади над кривой индукции флуоресценции с DBMIB к площади над кривой индукции флуоресценции с DCMU, выявило одинаковые значения соотношений площадей для дикого типа и мутанта SDH⁻ и более низкое соотношение у мутанта M55 по сравнению с диким типом. Эти данные указывают на ускоренный перенос электронов из стромы клеток мутанта M55 в пул пластохинонов на свету.

В отсутствие дегидрогеназ скорость темнового восстановления P700⁺ у обоих мутантов не снижалась, а у мутанта, лишенного NDH-1, даже возрастала по сравнению с таковой у дикого типа. DBMIB замедлял темновое восстановление P700⁺. Следовательно, независимо от присутствия дегидрогеназ, клетки способны осуществлять циклический перенос электронов через пул пластохинонов на P700⁺. Снижение уровня конечных акцепторов фотосинтеза и дыхания (NAD(P)⁺ и кислорода) в результате 30 мин предосвещения или при анаэробнозе замедляло фотоокисление P700 и ускоряло темновое восстановление P700⁺. Таким образом, скорость «редокс» превращений P700 при циклическом транспорте электронов в клетках дикого типа и мутантов *Synechocystis* определяется уровнем NADP⁺ и кислорода в строме [1].

1. Бобычевцева Ю.В., Еланская И.В., Карапетян Н.В. Биохимия 76, 2011, 526-537

ПУТИ ДЕГРАДАЦИИ ПЕРОКСИСОМ В РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ Peroxisome degradation pathways in plants

Ольга **ВОЙЦЕХОВСКАЯ**¹, Sigrun REUMANN²

¹Учреждение Российской академии наук Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург. Тел: +7(812)3463643, Факс: +7(812)3463643
E-mail: ovoitse@yandex.ru

²Faculty of Science and Technology, Centre for Organelle Research (CORE), University of Stavanger, Stavanger, Norway

Удаление избыточных или поврежденных органелл в клетках осуществляется в ходе автофагии. Этот процесс приобретает особое значение при недостатке питания, обеспечивая перестройку внутриклеточной структуры и утилизацию макромолекул, что позволяет клетке пережить стрессовые условия. В последнее время установлена важная роль автофагического пути в деградации клеточных компонентов не только в стрессовых, но и в нормальных условиях («конститутивная» автофагия). Удаление избыточных или поврежденных пероксисом в клетках животных и грибов осуществляется в процессе микро- и/или макроавтофагии, однако, у растений к настоящему времени неизвестны пути деградации пероксисом. Мы использовали клетки гетеротрофной суспензионной культуры табака Bright Yellow 2, стабильно трансформированные конструктом, где желтый флуоресцирующий белок EYFP, снабженный сигнальным пептидом SKL, обеспечивающим мечение пероксисом, был помещен под конститутивный промотор 35S. Это позволило наблюдать за процессами биогенеза и деградации пероксисом *in vivo*. Автофагия была индуцирована путем удаления из культивационной среды сахарозы. Биохимические и цитологические исследования показали, что ингибитор макроавтофагического пути 3-метиладенин вызывал значительное накопление EYFP-SKL, а также белка каталазы, в клетках, что указывало на участие макроавтофагии в процессах деградации пероксисом в условиях недостатка углеводов. Внутриклеточная локализация пероксисом совпадала с локализацией автолизосом и автофагических телец, что согласовалось с транспортом пероксисом в вакуоль для их последующей протеолитической деградации в ходе макроавтофагии. При нормальном росте клеток (без удаления из среды культивирования сахарозы) добавление 3-метиладенина в среду культивирования также вызывало значительное увеличение числа пероксисом в клетках, указывая на участие конститутивного макроавтофагического пути в процессах обновления пероксисомного пула растительных клеток в норме. Данные по динамике маркерных белков митохондрий и пластид TOM40 и TOC75 показали, что скорость «оборота» пероксисом в норме была значительно выше, чем у этих органелл. Результаты исследования позволяют предположить, что белки матрикса пероксисом даже в условиях отсутствия внешнего стресса подвержены сильному окислительному повреждению, и что специфические, пока не известные сигнальные пути в растительных клетках управляют селективной деградацией избыточных или дефектных пероксисом в отсутствие стресса.

ФОТОСИНТЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ, ВЫЗВАННЫМ ИЗБЫТКОМ ЦИНКА, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ АЗОТНОГО ПИТАНИЯ

The photosynthetic activity of wheat (*Triticum aestivum* L.) under oxidative stress caused by an excess of zinc depending on nitrogen supply

ГЛАЗУНОВА М.А., КАШИРИНА Е.И.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, 119899, Москва, Воробьевы Горы, МГУ, Биологический факультет, кафедра физиологии растений.
E-mail: plantphys@biophys.msu.ru; Телефон: (095) 939-12-09; Факс: 7(095)939-43-09

Растения, выращенные на разных источниках азота, отличаются по своим фенотипическим характеристикам на разных уровнях структурно-функциональной организации. Ранее нами на растениях пшеницы *Triticum aestivum* L., выращенных на нитрате, аммонии и при дефиците азота, была показана четкая зависимость ответных реакций растений на стрессовое воздействие. Добавление в среду выращивания 5 мМ ZnSO₄ вызывало окислительный стресс, о котором мы судили по накоплению малонового диальдегида. У листьев растений аммонийного варианта данный показатель был в два раза больше, чем у остальных. При этом ответ антиоксидантной системы растений всех трех вариантов был неоднозначным. Так окислительный стресс у растений NH₄⁺-варианта сопровождался увеличением активности СОД и пероксидазы с гваяколом, у NO₃⁻-варианта увеличивалась активность пероксидазы, у N_{деф} варианта увеличивалась активность глутатионредуктазы.

В связи с тем, что фотосинтез является одним из базовых процессов жизнедеятельности растения, целью данной работы было выявить влияние окислительного стресса, вызванного избытком цинка, на фотосинтетическую активность листьев растений пшеницы *Triticum aestivum* L. в зависимости от условий азотного питания.

Растения озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Инна выращивали до 21-дневного возраста в водной культуре на питательной среде, содержащей нитрат 3 мМ (NO₃⁻ вариант), 3мМ (NH₄⁺ вариант), или несодержащей азота (N_{деф} вариант). при температуре – день/ночь 22/18°C, освещенности 110 мкМ м² с⁻¹, фотопериоде 16 ч. В качестве стрессора использовался Zn (5мМ ZnSO₄ на семь суток). Потенциальную фотосинтетическую активность оценивали по скорости выделения кислорода тканями 2-го листа, которую определяли полярографически с ячейкой открытого типа, используя электрод Кларка. Определяли во 2-ом листе содержание пигментов фотосинтетического аппарата: хлорофилла а и b, каротиноидов.

Результаты показали, что у растений, снабжавшихся азотом, фотосинтетическая активность была выше, чем у N_{деф} растений, но снижалась при стрессовом воздействии: у NO₃⁻ варианта на 72%, а у NH₄⁺ варианта на 38%, тогда как у N_{деф} растений фотосинтетическая активность повышалась на 59% при стрессовом воздействии. Существенной разницы в содержании пигментов между вариантами отмечено не было.

Таким образом, азотное снабжение влияет на фотосинтетическую активность в целом, а также на чувствительность фотосинтетического аппарата к стрессовому воздействию.

**ФОТОСИНТЕЗ И ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА В ЛИСТЬЯХ
ПОДОРОЖНИКА СРЕДНЕГО В ПРИРОДНЫХ УСЛОВИЯХ**
Photosynthesis and chlorophyll fluorescence in plantain leaves under natural conditions

Тамара ГОЛОВКО, Илья ЗАХОЖИЙ, Игорь ДАЛЬКЭ, Ольга ДЫМОВА

Институт биологии Коми научного центра УрО РАН, Сыктывкар, 167982, Россия;
E-mail: golovko@ib.komisc.ru; Fax: +7-8212-24-01-63

Способность фотосинтезировать в нестабильной среде и сохранять структурно-функциональную целостность фотосинтетического аппарата (ФСА) при стрессе обеспечиваются взаимодействием регуляторных механизмов на разных уровнях организации фотосинтезирующей системы. Ключевой компонент ФСА – ФС 2, являясь мишенью для многих стресс-факторов, участвует в сигналинге и формировании адаптивного ответа. Ранее на основе комплексного изучения морфофизиологических показателей листьев нами была показана функциональная пластичность ФСА растений *Plantago media* (подорожник средний) в природных условиях (Головко и др., 2011). Целью данной работы было выявить состояние и реакцию ФС2 на воздействие факторов среды, индуцирующих фотоингибирование. Для этого в аномально теплом и сухом июле 2010 г. исследовали суточную динамику CO_2 -газообмена (портативная система LcPro), флуоресценцию хлорофилла *a* (флуориметр РАМ-2100), содержание и состав фотосинтетических пигментов (ВЭЖХ). Установлено, что скорость нетто-фотосинтеза листьев световых (С) растений, произрастающих на открытых известняковых обнажениях Южного Тимана, достигала максимума, 12–14 $\mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2\text{s}$, в ранние утренние часы и снижалась на порядок к полудню, когда температура воздуха достигала 35–37°C, а листа была на 2–3°C больше. Второй максимум, около 4 $\mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2\text{s}$, отмечали ближе к вечеру при низкой освещенности. Дневной ход фотосинтеза листьев теневых (Т) растений, обитающих в травостое, был более выровненным, но скорость ассимиляции не превышала 4 $\mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2\text{s}$. Максимальная фотохимическая активность ФС2 (Fv/Fm) С-листьев рано утром была близка к норме (0,80), а в дневные часы составляла около 0,70, что может свидетельствовать о появлении поврежденных комплексов ФС2. У Т-листьев снижение Fv/Fm проявлялось слабее и приходилось на вторую половину дня. Показатель фотохимического тушения флуоресценции хлорофилла (qP), характеризующий долю открытых РЦ ФС2, у С-листьев в дневные часы не превышал 0,5, тогда как рано утром и поздно вечером был почти вдвое выше. Одновременно изменялся и показатель нефотохимического тушения (qN), достигая в дневные часы значений 0,9. Величина qP Т-листьев в течение дня изменялась в пределах 0,8–0,9, значение qN увеличивалось до 0,3. Чтобы выявить механизм qN, исследовали степень де-эпоксидации пигментов виолаксантинового цикла (DEPS). Уже в утренние часы и на протяжении дня уровень DEPS у С-растений был существенно выше, чем у Т-растений. Выявлена прямая связь между величиной тепловой диссипации энергии и DEPS. Заключение: активация зеаксантин-зависимого механизма тепловой диссипации поглощенной ССК ФС 2 энергии способствует защите ФСА подорожника при фотоингибировании.

**ФОТОХИМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФС II ГЕНОТИПОВ ПШЕНИЦЫ,
ВЫРАЩЕННЫХ ПРИ ПОЧВЕННОЙ ЗАСУХЕ**
Photochemical efficiency of PS II of wheat genotypes grown under soil drought stress

Ирада ГУСЕЙНОВА, Самира РУСТАМОВА, Джалал АЛИЕВ

Институт ботаники НАН Азербайджана, Баку AZ 1073, Азербайджан;
E-mail: huseynova-i@botany-az.org; Тел: (994-12) 438 1164; Факс: (994-12) 510 2433

Фотосинтез, являясь ключевым процессом первичного метаболизма, играет центральную роль в жизнедеятельности растений в условиях засухи. Значения F_v/F_m отражают потенциальный квантовый выход ФС II и используются в качестве чувствительного индикатора состояния фотосинтеза. В представленной работе использовали генотипы пшеницы, различающиеся по засухоустойчивости – *Triticum durum* L.: Баракатли-95 (засухоустойчивый) и Гарагылчыг-2 (не устойчивый к засухе); и *Triticum aestivum* L.: Азаматли-95 (засухоустойчивый) и Гийматли-2/17 (не устойчивый к засухе). Растения были взяты из экспериментальной базы Научно-исследовательского Института Земледелия (Баку, Азербайджан). Генотипы были выращены в полевых условиях на большой площади при нормальном водообеспечении и в условиях почвенной засухи. Обезвоживание достигалось предотвращением полива. Опыты проводились во всех фазах онтогенеза. При водном дефиците в фазе выхода в трубку потенциальный квантовый выход ФС II у Баракатли-95 была на уровне контроля. В начале фазы колошения наблюдается снижение этого параметра. Самое максимальное значение для потенциального квантового выхода ФС II у Баракатли-95 наблюдается в конце фазы колошения ($F_v/F_m=0,82$). В конце цветения в стрессовом варианте оно существенно снижается. Во время восковой спелости значение F_v/F_m стабилизируется в стрессовом варианте и снижается до минимума в контрольном. У генотипа Гарагылчыг-2 разница в значении F_v/F_m возникла уже в самом начале стресса, так как в фазе выхода в трубку в контрольном варианте значение $F_v/F_m=0,77$, в стрессовом варианте $F_v/F_m=0,84$. В конечных фазах онтогенеза, когда засуха более суровая, потенциальный квантовый выход ФС II у неустойчивого к засухе генотипа Гарагылчыг-2 снижается по сравнению с контролем. У генотипа Азаматли-95 максимальные значения фотохимической эффективности ФС II наблюдаются в фазе выхода в трубку: в контрольном варианте $F_v/F_m=0,85$, в стрессовом варианте $F_v/F_m=0,87$. С начала фазы колошения до конца фазы цветения этот параметр был ниже контроля. В фазе молочной спелости отношение F_v/F_m повышалась по сравнению с контролем. У генотипа Гийматли-2/17 в отличие от Азаматли-95 самые низкие значения для F_v/F_m наблюдаются в начале онтогенеза – в фазе выхода в трубку: контроль $F_v/F_m=0,77$, стресс $F_v/F_m=0,75$. Для растений подверженных засухе самое высокое значение F_v/F_m наблюдается в начале фазы цветения ($F_v/F_m=0,83$). В конце цветения у неорошаемых растений величина F_v/F_m резко снижается ($F_v/F_m=0,78$). В фазе молочной спелости, наоборот, у контрольных растений наблюдается снижение этого параметра, а у стрессовых оно повышается от контроля. Во время фазы восковой спелости значение F_v/F_m у Гийматли-2/17 существенно снижается и падает ниже контрольного значения.

**РЕГУЛЯЦИЯ ЦИКЛИЧЕСКОГО ТРАНСПОРТА ЭЛЕКТРОНОВ ЧЕРЕЗ
ФОТОСИСТЕМУ I В КЛЕТКАХ ЦИАНОБАКТЕРИИ
SYNECHOCYSTIS SP. PCC 6803**

**Regulation of Photosystem I mediated cyclic electron transport
in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803**

**Ирина ЕЛАНСКАЯ¹, Кирилл ТИМОФЕЕВ¹, Юлия БОЛЫЧЕВЦЕВА²,
Елена МУРОНЕЦ¹, Евгений ЛУКАШЕВ¹, Виктория ТОПОРОВА³**

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 119992, Россия;
E-mail: ivelanskaya@mail.ru; Fax: +7-495- 939-29-57;

²Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Ленинский пр., 33, Москва, 119071, Россия;
E-mail: bolychev@inbi.ras.ru; Fax: +7-495-954-27-32;

³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, Москва, 117997, Россия;
E-mail: Rhuta@rambler.ru; Fax: +7-495-335-71-03

В циклическом транспорте электронов (ЦТЭ) с участием Фотосистемы I (ФСІ) электроны от ферредоксина (Fd), восстановленного в результате фотохимических реакций в ФСІ, могут быть возвращены в пул пластохинона (PQ) двумя путями: Fd-зависимым и NADPH-зависимым. Fd-зависимый ЦТЭ в хлоропластах связан с функцией продукта гена PGR5, а у цианобактерий – с функцией гена *ssr2016*, имеющего гомологию с PGR5. NADPH-зависимый ЦТЭ осуществляется с участием дегидрогеназного комплекса NDH1, который в тилакоидной мембране цианобактерий участвует и в дыхательном транспорте электронов. Поскольку в восстановлении пула PQ участвуют дыхательные дегидрогеназы, изменение количества дыхательных субстратов в цитоплазме клеток цианобактерий может влиять на активность циклического транспорта электронов через ФСІ. У цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 можно существенно увеличить концентрацию дыхательных субстратов в цитоплазме добавлением глюкозы, которая окисляется в реакциях пентозофосфатного пути, сопровождающихся образованием NADPH.

С помощью метода ЭПР-спектроскопии изучено влияние глюкозы, а также ряда ингибиторов электронного транспорта на кинетику темнового восстановления окисленного светом в присутствии диурона реакционного центра ФСІ (P700⁺) в интактных клетках дикого типа *Synechocystis* sp. PCC 6803 и мутантов, имеющих нарушения на отдельных этапах фотосинтетического или дыхательного транспорта электронов. Показано, что Ssr2016-зависимый транспорт является основным путем ЦТЭ в клетках цианобактерии и его активность возрастает в солеадаптированных клетках. Добавление глюкозы приводило к увеличению скорости темнового восстановления P700⁺ у большинства мутантов, включая мутант по дегидрогеназе NDH1, однако этот эффект отсутствовал в клетках мутанта Ssr2016. Таким образом, активация ЦТЭ при увеличении концентрации дыхательных субстратов в цитоплазме клеток цианобактерии может быть вызвана снижением уровня NADP⁺ – конечного акцептора электронов от ФСІ при нециклическом транспорте.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 09-04-01119-а).

**РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ ХЛОРОПЛАСТНЫХ ГЕНОВ
HORDEUM VULGARE БРАССИНОСТЕРОИДАМИ**

The regulation of *Hordeum vulgare* chloroplast genome transcription by brassinosteroids

**Марина ЕФИМОВА¹, Александр КРАВЦОВ², Владимир КУЗНЕЦОВ²,
Раиса КАРНАЧУК¹, Владимир ХРИПАЧ³, Виктор КУЗНЕЦОВ²**

¹Томский государственный университет, 634050, г. Томск, Россия
E-mail: stevia555@mail.ru; Tel./Fax: +7 3822 529765

²Учреждение Российской академии наук Институт физиологии растений
им. К.А.Тимирязева РАН, 127276, г. Москва, Россия.

³Институт биоорганической химии НАНБ, 220141, г. Минск, Беларусь.

Регуляция светового развития растений фитогормонами происходит не только на уровне морфологических изменений. Детальные исследования позволили продемонстрировать вклад фитогормонов в реализацию экспрессии фотосинтетических генов, кодируемых ядерным и хлоропластным геномами. Многие исследователи отмечают важную роль гормонов-антагонистов цитокининов и абсцизовой кислоты, наряду со светом в процессе формирования фотосинтетического аппарата двудольных и однодольных растений. Предполагается, что брассиностероиды в темноте способны «имитировать» действие света.

С помощью метода run-on транскрипции была изучена скорость транскрипции 12 хлоропластных генов арабидопсис в ответ на экзогенный брассиностероид – эпибрассинолид. Основой транскрипционной системы служили лизированные хлоропласты, выделенные из первых листьев 9-дневных растений ячменя (*Hordeum vulgare* L., сорт Луч), выращенных в темноте. Хлоропластные гены, анализируемые нами, относились к функционально-различным группам генов пластома. Прежде всего, это гены, продукты которых выполняют первостепенную роль для протекания фотосинтеза – гены фотосистемы I – *psa* (*psaA* и *psaB*), фотосистемы II – *psb* (*psbA*, *psbD* и *psbK*), ген большой субъединицы Рубиско (*rbcL*), АТФ синтетазного комплекса – *atp* (*atpB*) и НАДФН дегидрогеназного комплекса – *ndhF*. Среди генов “домашнего хозяйства” нами изучена транскрипция гена, кодирующего β субъединицу РНК-полимеразы бактериального типа (*rpoB*), гены 16S и 23S рибосомальной РНК (*rnm16* и *rnm23*) и гены Glu и Tug транспортных РНК (*trnE-Y*).

Нами отмечены значительные различия транскрипции пластидных генов в этиолированных листьях ячменя, инкубированных на растворе воды и 1 мкМ раствора эпибрассинолида. В целом, транскрипционная активность всех 12 изучаемых генов была значительно выше в листьях, инкубированных на растворе эпибрассинолида. Наибольшие различия (в 5–20 раз) отмечены для 9 свето-регулируемых генов (*psaA*, *psaB*, *psbA*, *psbD*, *psbK*, *rbcL*, *ndhF*, *rnm16*, *rnm23*).

Таким образом, нами показано, что обработка брассиностероидами активирует транскрипцию свето-регулируемых хлоропластных генов ячменя в темноте.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (11-04-90806-моб_ст).

**ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЙ
АППАРАТ ПШЕНИЦЫ**
High temperature effects on chlorophyll fluorescence and CO₂-exchange in wheat leaves

Илья ЗАХОЖИЙ, Игорь ДАЛЬКЭ, Тамара ГОЛОВКО

Институт биологии Коми научного центра Уральского центра Российской академии наук, Сыктывкар, 167982, Россия
E-mail: zakhozhiy@ib.komisc.ru; Fax: (8212)-24-01-63

Целью работы было изучение действия и последствия высокой температуры на фотосинтетический аппарат яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L., линия 232). Растения выращивали гидропонным способом в замкнутых камерах Института биофизики СО РАН, при круглосуточном освещении 150 Вт/м² ФАР, температуре 24°C и относительной влажности воздуха 60%. 15-суточные растения подвергали действию температуры 44°C при 0, 150 и 250 Вт/м² ФАР (варианты 1, 2 и 3 соответственно) в течение 4 ч. После экспозиции растения возвращали в исходные условия. Эффекты высокотемпературного стресса на ФА оценивали сразу, спустя 24 и 48 ч после окончания действия. Показатели флуоресценции хлорофилла *a*, определяли с помощью РАМ -2100, содержание пигментов – спектрофотометрически, скорость CO₂-газообмена и транспирации – ИКГ LI-7000. Действие высокой температуры приводило к изменению фона зеленых и желтых пигментов. Содержание хлорофиллов к концу 4 ч экспозиции растений при 44°C в темноте и на свету снижалось в среднем на 20%. Через 48 ч после прекращения температурного воздействия концентрация хлорофиллов в листьях составляла 7,2–7,8 мг/г сухой массы, каротиноидов – 1,7–2,0 мг/г сухой массы, что на 25–30% ниже по сравнению с растениями в контроле. Величина параметра Fv/Fm, характеризующего максимальный квантовый выход ФС2, у световых вариантов (2 и 3) изменялась незначительно. При действии высокой температуры на растения в темноте происходило значительное снижение Fv/Fm. К концу 4 ч экспозиции при 44°C величина этого показателя составила 0,33 отн.ед., что в 2,3 раза ниже по сравнению с контролем. После прекращения действия стресс-фактора величина Fv/Fm в листьях растений варианта 1 повышалась и через 48 ч репарации достигала 85% от контроля. Во время температурного стресса во всех вариантах опыта отмечали резкое падение скорости видимого фотосинтеза листьев растений. В конце 4 ч экспозиции регистрировали выделение CO₂ листьями опытных растений. Спустя 48 ч после прекращения высокотемпературного воздействия отмечали полное восстановление видимого фотосинтеза у растений варианта 1, тогда как у растений вариантов 2 и 3 данный показатель оставался на 40% ниже по сравнению с контролем. В другой серии опытов с пшеницей в фазе начало колошения выявлена более высокая чувствительность к тепловому стрессу фотосинтетического аппарата флагового листа по сравнению с нижерасположенными листьями.

Таким образом, установлено протекторное влияние умеренной освещенности на первичные процессы фотосинтеза во время действия высоко температурного стресса на растения пшеницы. Восстановление фотосинтетического метаболизма углерода быстрее протекало у растений, испытывавших температурный стресс в темноте.

Работа выполнена при поддержке грантом УрО РАН № 09-С-4-1006.

**ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ВЕЛИЧИНУ СВЕТОЗАВИСИМОГО
ПОГЛОЩЕНИЯ ПРОТОНОВ И ТРАНСМЕМБРАННЫЙ
ПРОТОННЫЙ ГРАДИЕНТ**

В ИЗОЛИРОВАННЫХ ТИЛАКОИДАХ

**Effect of temperature on light-induced proton uptake and transmembrane proton gradient
in isolated thylakoids**

Елена ЗОЛОТАРЁВА

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев, Украина;
E-mail: e.zolotareva@hotmail.com; тел./факс: (38044)2344041

Известно, что при освещении слабозабуференной суспензии изолированных тилакоидов регистрируется защелачивание реакционной среды, связанное с фотосинтетическим транспортом протонов внутрь тилакоидов и формированием трансмембранного протонного градиента (ΔpH) [1]. Величина светоиндуцированного протонного поглощения (ΔH^+) определяется количеством внутритилакоидных буферных групп, природа которых не установлена. Целью работы был анализ данных, полученных при изучении светоиндуцированного протонного поглощения и формирования ΔpH в хлоропластах, изолированных из растений, выращенных при различных температурах.

Хлоропласты изолировали из листьев 14-дневных растений гороха, выращенных в теплице при 12 час освещения и 12 час темнового периода и температуре 25°C (контроль) и в условиях, имитирующих ночное падение температуры (6–8°C). Использовались также растения, выращенные в грунте при среднесуточной температуре 18 и 9°C. Величину трансмембранного ΔpH в хлоропластах оценивали по распределению липофильной рН-зависимой флуоресцентной метки 9-аминоакридина (9-AA) измеряли на флуориметре XE-PAM (“Walz”, Германия).

Известно, что жирнокислотный состав тилакоидных мембран и, как следствие, их текучесть зависят от температуры выращивания растений [2]. При ее понижении синтезируется больше ненасыщенных жирных кислот, что обеспечивает нормальное функционирование мембранных процессов, в том числе электронного транспорта, зависящего от латеральной подвижности пластохинона. В работе показано, что величина ΔH^+ в суспензии изолированных тилакоидов зависит как от температуры реакционной среды, так и температурных условий выращивания растений. В хлоропластах изолированных из контрольных растений, ΔH^+ регистрировался при температурах 14–25°C, тогда как в хлоропластах растений, выращенных при пониженных среднесуточных температурах – при 8–15°C. Величина ΔpH значительно меньше зависит от температуры, и при ее повышении в диапазоне 6–25°C постепенно снижается. В контрольных хлоропластах величина ΔpH при температурах 6–14°C составляла около 3,8 ед. рН, тогда как $\Delta H^+ = 0$. Данные указывают на то, что при низких температурах линейный транспорт электронов блокируется из-за потери подвижности пластохинона, но поступление протонов внутрь тилакоидов в реакции фотоокисления воды сохраняется, что и обеспечивает поддержание ΔpH .

1. Walz D., Goldstein L., Avron M. *Eur. J. Biochem.*, 1974, 47 (3), 403.

2. Allakhverdiev S.I., Los D.A. and Murata N. *In Lipids in Photosynthesis. Essential and Regulatory Functions*, Springer Science + Business Media B., 373.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ КИСЛОРОДА В ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНОЙ ЦЕПИ

Oxygen reduction in photosynthetic electron transport chain

Борис ИВАНОВ, Сергей ХОРОБРЫХ, Марина КОЗУЛЕВА, Илья НАЙДОВ,
Мария МУБАРАКШИНА

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Московская область,
142290, Россия; E-mail: ivboni@tambler.ru

Кислород – естественный акцептор электронов в фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ФЭТЦ). Первичный продукт восстановления молекул O_2 – супероксидный анион-радикал $O_2^{\cdot-}$. С помощью детекторов $O_2^{\cdot-}$ разной липофильности показано, что значительная часть супероксидных радикалов образуется внутри тилакоидной мембраны [1]. Ферредоксин, часто предполагающийся как основной восстановитель O_2 , почти не участвует в этом процессе в присутствии НАДФ⁺ при высокой интенсивности света, то есть, при физиологических условиях [2].

Акцепторная сторона Фотосистемы 1, где расположены переносчики с низкими редокс-потенциалами, является основным местом первичного восстановления молекул O_2 в ФЭТЦ высших растений. Нами было обнаружено, что восстановление O_2 осуществляется также в пуле пластохинона (ПХ-пул) и что непосредственным восстановителем служит свободный пластосемихинон [3]. Скорость восстановления молекул O_2 в ПХ-пуле невелика, однако, вклад ПХ-пула в восстановление кислорода при функционировании всей ФЭТЦ оказался весьма значителен, превышая 50% при высокой интенсивности света [4].

Перекись водорода, относительно стабильная форма восстановленного кислорода, образуется в хлоропластах как вследствие дисмутации супероксидов в строме, так и при их восстановлении. Было найдено, что часть молекул H_2O_2 образуется внутри тилакоидной мембраны и что процент электронов, участвующих в этом образовании близок к вкладу ПХ-пула в восстановление кислорода [5]. Полученные данные предполагают протекание в мембране тилакоидов реакции между $O_2^{\cdot-}$ и пластогидрохиноном [6]. Экспериментально наблюдаемая двухфазная кинетика окисления восстановленного ПХ-пула в темноте [7] хорошо описывается кинетической схемой, включающей эту реакцию, которая обеспечивает не только удаление опасного для мембран радикала $O_2^{\cdot-}$, но и генерацию H_2O_2 как важной сигнальной молекулы, способной передавать информацию о редокс-состоянии ПХ-пула системам экспрессии хлоропластных и ядерных генов.

1. Kozuleva M., Klenina I., Proskuryakov I., Kirilyuk I., Ivanov B. *FEBS Letters*, 2011, 585 (7), 1067
2. Kozuleva M., Ivanov B. *Photosynth. Res.*, 2010, 105 (1), 51
3. Khorobrykh S., Ivanov B. *Photosynth. Res.*, 2002, 71 (3), 209
4. Khorobrykh S., Mubarakshina M., Ivanov B. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, 1657 (2-3), 164
5. Mubarakshina M., Khorobrykh S., Ivanov B. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, 1757 (11), 1496
6. Mubarakshina M., Ivanov B. *Physiol. Plantarum*, 2010, 140 (2), 103
7. Ivanov, B., Mubarakshina, M., Khorobrykh, S. *FEBS Letters*, 2007, 581 (7), 1342

**КАРБОАНГИДРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ФС2 ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ:
ПРИРОДА И КОЛИЧЕСТВО НОСИТЕЛЕЙ**
Carbonic anhydrase activity of higher plants PS2: the origin and amount of carriers

ИГНАТОВА Л.К., РУДЕНКО Н.Н., ФЕДОРЧУК Т.П., ИВАНОВ Б.Н.

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино, Московской обл.,
142290, Россия
E-mail: lkign@rambler.ru; Phone: (4967) 73-24-48; Fax: (4967)33-05-32

Карбоангидразная активность (КА-активность) в тилакоидах высших растений была обнаружена еще в начале 80-х годов. Было доказано наличие КА-активности в участках тилакоидной мембраны, обогащенных фотосистемой 2, и получены данные, предполагающие присутствие там нескольких источников этой активности [1-3]. Однако до настоящего времени не установлена природа этих источников.

Эксперименты проводили на препаратах тилакоидных мембран, обогащенных фотосистемой 2 (ФС2-мембраны) из шпината, гороха и арабидопсиса. Было найдено, что один из носителей КА-активности удаляется при обработке этих мембран солями в высокой концентрации и детергентами, и что этот носитель имеет белковую природу (низкомолекулярная КА). Другой носитель связан с высокомолекулярными компонентами ФС2-комплекса. Нами было обнаружено, что низкомолекулярная КА обладает необычным свойством, – ее активность возрастает в присутствии низких концентраций гидрофильных ингибиторов карбоангидраз, ацетазоламида и азиды, тогда как наномолярные концентрации липофильного ингибитора, этоксизоламида, полностью подавляют ее активность. Источником этой активности может быть как белок, входящий в состав ФС2, так и не установленная до настоящего времени КА. При проверке предположения о том, что КА-активностью обладает белок 33 кДа, - марганец стабилизирующий люменальный белок кислородвыделяющего комплекса, – было установлено, что изолированный из шпината 33 кДа не обладал КА-активностью даже в присутствии ионов марганца. Было также найдено, что ФС2-мембраны, лишённые люменальных белков 23 кДа и 16 кДа и потерявшие после обработки 1 М CaCl₂, как показал вестерн-блот анализ, почти весь 33 кДа белок, проявляли заметную КА-активность. Активность низкомолекулярной КА хорошо сохраняется в геле и элюатах из него без введения восстановителей SH-групп. В пользу того, что это не какой-либо из известных белков ФС2, а неизвестная КА, свидетельствует то, что КА-активность ФС2-мембран с 3 мкг хлорофилла эквивалентна активности 30 нг КА эритроцитов, одной из самых активных карбоангидраз.

КА-активность высокомолекулярных компонентов ФС2-мембран в отличие от активности низкомолекулярной КА эффективно подавлялась ацетазоламидом. Эта активность наблюдалась в геле после нативного электрофореза в полосе, содержащей белки ближней антенны корового комплекса ФС2, CP43 и CP47, что было установлено с помощью масс-спектрального анализа.

1. Khrustin M., Ignatova L., Rudenko N., Ivanov B., Klimov V., *FEBS letters*, 2004, 577, 305

2. Игнатова Л., Руденко Н., Христин М., Иванов Б., *Биохимия*, 2006, 71(5), 651

3. Rudenko N., Ignatova L., Ivanov B., *Photosynth. Res.* 2007, 91, 81

**ПИГМЕНТЫ КСАНТОФИЛЛОВОГО ЦИКЛА В ЭТИОЛИРОВАННЫХ
И ЗЕЛЕННЫХ ПРОРОСТКАХ ЗЛАКОВ ПРИ ТЕПЛОВОМ СТРЕССЕ**
**The pigments of xanthophyll cycle in cereal etiolated and green seedlings
under heat stress**

**Людмила КАБАШНИКОВА¹, Галина САВЧЕНКО¹, Лариса АБРАМЧИК¹,
Наталья ПШИБЫТКО¹, Kazimierz STRZALKA²**

¹Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск,
220072, Беларусь;

E-mail: kabashnikova@mail.ru; Fax: +375 (17) 284 23 59;

²Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University,
31-586 Krakow, Poland

Изучали реакцию каротиноидов на тепловое воздействие (3–5 ч, 42–44°C) в этиолированных (выращивание в рулонах при 23°C в течение 7–8 сут) и зеленых (интенсивность освещения 64 мкмоль м⁻² с⁻¹, фотопериод 16 ч) проростках тритикале (короткостебельный и длинностебельный сорта, различающиеся эндогенным уровнем АБК) и ячменя (сорт Гонар). На стадии этиоляции относительное содержание лютеина, β-каротина и ксантофиллов (виолаксантин + антраксантин + зеаксантин) составляло у разных сортов в контроле соответственно 35–55, 1–5, и 34–40% от общего содержания каротиноидов. После теплового шока у всех исследованных злаков обнаружены изменения только относительного содержания ксантофилловых пигментов: уровень виолаксантина при нагревании снижался, а зеаксантина увеличивался. Интенсивность этого превращения статистически надежно возрастала по мере увеличения продолжительности гипертермии и после 5ч нагревания проростков тритикале при 42°C степень дезоксидации [зеаксантин/(зеаксантин + виолаксантин)] приближалась к 0,9. Доля антраксантина (39–49% от суммы ксантофиллов) при этом снижалась не более чем на 20%.

В зеленых проростках в норме доминировали лютеин (около 47%) и β-каротин (до 22%), а общее количество пигментов ксантофиллового цикла не превышало 18% от суммы всех каротиноидов. Среди ксантофиллов преобладал виолаксантин (до 97%). Нагревание даже в течение 5 ч при 44°C при невысокой интенсивности освещения (64 мкмоль м⁻² с⁻¹) не вызывало изменений относительного содержания ни одного из каротиноидов, включая ксантофиллы. Этот процесс не зависел от уровня эндогенной АБК в листьях, на синтез которой могла бы расходоваться часть виолаксантинового пула.

Полученные результаты свидетельствуют об активизации превращений ксантофилловых пигментов в растениях злаков при тепловом стрессе на стадии этиоляции. Отсутствие активности ксантофиллового цикла при гипертермии в зеленых проростках на неярком свете указывает на протекторное действие в этих условиях иных защитных систем.

РЕГУЛЯЦИЯ МИГРАЦИИ ЭНЕРГИИ В ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОМ АППАРАТЕ ЦИАНОБАКТЕРИЙ: НЕФОТОХИМИЧЕСКОЕ ТУШЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Regulation of energy migration in the photosynthetic apparatus of cyanobacteria:
non-photochemical quenching of fluorescence

Навасард **КАРАПЕТЯН**¹, Федор **КУЗЬМИНОВ**², Ирина **ЕЛАНСКАЯ**³,
Марина **РАХИМБЕРДИЕВА**⁴

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва 119071, Россия;

E-mail: nkarap@inbi.ras.ru, fax: 7-495-954-27-32

²Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва 119991, Россия;

³Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва 119991, Россия

Эффективность фотосинтеза максимальна при низкой интенсивности света, но существенно падает при высоких интенсивностях вследствие перехода реакционных центров в закрытое состояние, что стимулирует диссипацию поглощенной энергии в тепло. Цианобактерии обнаруживают эффективное нефотохимическое тушение возбужденных состояний, которое регулирует поток энергии к фотосистемам, предотвращая повреждение фотосинтетического аппарата при избыточной интенсивности света [1]. При освещении сине-зеленым светом клеток цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 происходит тушение флуоресценции фикобилисом (PBS), обратимое в темноте. Переход непотушенного состояния PBS в потушенное обусловлен взаимодействием локализованного вне мембран оранжевого каротин-связывающего белка (ОСР) с кором фикобилисом [2]. Измерения активности фотосистемы 1 и фотосистемы 2 цианобактерий в потушенном и непотушенном состояниях у мутантов *Synechocystis*, лишенных фотосистемы 1 или фотосистемы 2, показали, что тушение флуоресценции сопровождается падением примерно на 30–40% миграции энергии возбуждения от PBS к реакционным центрам обеих фотосистем [3].

У мутанта *Synechocystis*, лишенного обеих фотосистем, при 288 К обнаруживается интенсивное (до 85%) тушение флуоресценции полос при 680 и 660 нм, обусловленное изменением испускания аллофиокцианов (АФС). В спектре тушения флуоресценции, измеренном при 77 К, обнаруживается преимущественно полоса при 680 нм [4]. Показано, что фотоиндуцированное тушение флуоресценции исчезает при кратковременном нагревании клеток *Synechocystis* до 53°C. Так как предварительное нагревание не сказывается на спектре испускания АФС, предполагается, что исчезновение тушения обусловлено нарушением взаимодействия ОСР-АФС вследствие повреждения ОСР [4]. У мутанта, лишенного обеих фотосистем, при выключении действующего света 503 нм (10000 мкмоль фотонов м⁻² сек⁻¹) обнаружена темновая стадия в образовании тушащего центра. Следовательно, фотоактивация ОСР и образование тушащего центра в коре ФБС *in vivo* являются отдельными этапами многостадийного процесса, характерного для фотосенсорных белков [4].

1. Карапетян Н.В. Биохимия, 2007, 72, 1385

2. Karapetyan N.V. Photosynth. Res. 2008, 97, 195

3. Rakhimberdieva M.G., Elanskaya I.V., Vermaas W.F.J., Karapetyan N.V. Biochim. Biophys.

Acta (Bioenergetics) 2010, 1797, 241

4. Rakhimberdieva M.G., Kuzminov F.I., Elanskaya I.V., Karapetyan N.V. FEBS Lett. 2011, 585, 585

**МИТОХОНДРИАЛЬНО-АДРЕСОВАННЫЕ ХИНОНЫ ПРЕДОТВРАЩАЮТ
ВЫЗВАННУЮ ЦИАНИДОМ ИЛИ ХИТОЗАНОМ ГИБЕЛЬ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ**
**Mitochondria-addressed quinones prevented plant cell death
that was caused by cyanide or chitosan**

Виталий САМУИЛОВ, Дмитрий КИСЕЛЕВСКИЙ

Кафедра иммунологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова,
Москва, 119991, Россия

CN⁻ или хитозан вызывали гибель клеток в эпидермисе листьев гороха с признаками апоптоза, формы программируемой гибели клеток (ПКС): конденсацией и маргинацией хроматина, фрагментацией и разрушением ядер, межнуклеосомной фрагментацией ядерной ДНК [1,2]. Гибель клеток регистрировали по разрушению клеточных ядер. CN⁻ вызывал разрушение ядер как в эпидермальных клетках (не содержащих хлоропластов), так и в фотосинтезирующих устьичных клетках. В отличие от цианида хитозан индуцировал разрушение ядер эпидермальных, но не устьичных клеток. Показано участие хлоропластов в CN⁻-индуцированной ПКС устьичных клеток гороха. Предположительно ПКС у растений зависит не только от активных форм кислорода (АФК), генерируемых электронтранспортной цепью хлоропластов в условиях освещения, но зависит также от редокс-состояния пластохинона на участке о *b₆/f*-цитохромного комплекса [1].

Убихинон или пластохинон, ковалентно связанные с проникающими катионами децилтрифенилфосфония (ДТФФ⁺) или родамина [3], предотвращали ПКС в эпидермисе из листьев гороха, индуцированную цианидом или хитозаном. Полумаксимальные концентрации для защитного действия производных хинонов находились в пико- и наномолярном интервале. Защитное действие хинонов снижалось протонифицирующим разбавителем и снижалось проникающими катионами тетрафенилфосфония. В концентрациях, превышающих 10⁻⁸–10⁻⁷ М, испытанные производные ускоряли CN⁻-индуцированную ПКС. ДТФФ⁺-производные хинонов, в отличие от пластохинона, связанного с катионом родамина (SkQR1), подавляли образование H₂O₂ в клетках в ответ на добавленный менадион, но не H₂O₂, SkQR1, а также этиловый эфир тетраметилродамина и родамин 6G, стимулировали образование H₂O₂ в клетках. CN⁻-индуцированное разрушение ядер в устьичных клетках предотвращалось ДТФФ⁺-производными хинонов в темноте, но не на свету. SkQR1 подавлял разрушение ядер в устьичных клетках и в темноте, и на свету и по своему действию на свету был сходен с родамином 6G, препятствующим разрушению ядер, вызванному CN⁻ на свету, но не в темноте. Данные о защитном действии катионных производных хинонов свидетельствуют об участии митохондрий в ПКС у растений в темноте. В условиях освещения регуляция ПКС, вызванной CN⁻, по-видимому, осуществляется хлоропластами.

1. Samuilov V.D., Lagunova E.M., Kiselevsky D.B., Dzyubinskaya E.V., Makarova Ya.V., Gusev M.V., *Biosci. Rep.*, 2003, 23, 103

2. Васильев Л.А., Дзюбинская Е.В., Зиновкин Р.А., Киселевский Д.Б., Лобышева Н.В., Самуилов В.Д., *Биохимия*, 2009, 74, 1270

3. Скулачев В.П., *Биохимия*, 2007, 72, 1700

**ПРИ ВОССТАНОВЛЕНИИ КИСЛОРОДА СУПЕРОКСИДНЫЙ
АНИОН-РАДИКАЛ ОБРАЗУЕТСЯ ВНУТРИ ТИЛАКОИДНОЙ МЕМБРАНЫ**
**In the course of oxygen reduction the superoxide anion-radical is generated
within thylakoid membrane**

Марина КОЗУЛЕВА, Ирина КЛЕНИНА, Иван ПРОСКУРЯКОВ, Борис ИВАНОВ

Учреждение Российской академии наук Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Московская область, 142290, Россия;
kozuleva@gmail.com; Fax: +7-4967- 330532

Восстановление кислорода переносчиками фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ФЭТЦ) – один из путей регуляции электронного транспорта в хлоропластах. Первичный продукт этого процесса – супероксидный анион-радикал, $O_2^{\cdot-}$, – является деструктивным агентом, и осуществляемое антиоксидантными системами хлоропласта превращение $O_2^{\cdot-}$ в более стабильное соединение, перекись водорода, H_2O_2 , играет ключевую роль для сохранения структуры и функций этой органеллы [1]. При этом H_2O_2 и $O_2^{\cdot-}$ являются также сигнальными агентами, способными информировать хлоропластные и клеточные системы регуляции о состоянии ФЭТЦ в конкретных условиях среды [2]. Определяющим как для деструктивного действия, так и для выполнения сигнальной функции, является место генерации $O_2^{\cdot-}$ – в тилакоидной мембране или в строме. Экспериментальные данные, свидетельствующие об образовании супероксидов в тилакоидной мембране, до сих пор отсутствовали.

В работе применены детекторы $O_2^{\cdot-}$ на основе циклических гидроксиламинов (ЦГА), которые окисляются супероксидом с образованием нитроксильного радикала, регистрировавшегося с помощью спектроскопии ЭПР. Были использованы ЦГА, различающиеся растворимостью в средах разной полярности, – гидрофильный ДСР-Н и липофильный ТМТ-Н. Эффект супероксиддисмутазы, ускоряющей дисмутацию супероксидов в одной среде и, таким образом, предотвращающей реакцию $O_2^{\cdot-}$ и ЦГА в водной фазе, непосредственно выявил образование супероксида внутри мембраны. Обнаружено, что нитроксильные радикалы, образованные при окислении липофильного ТМТ-Н, эффективно восстанавливаются мембранными переносчиками ФЭТЦ. С учетом этого процесса оценено, что в среднем около 35% от всех супероксидов образуется внутри тилакоидной мембраны.

1. Иванов Б.Н., *Биохимия*, 2008, 73 (1), 112

2. Foyer C.H., Noctor G., *Anthoxid Redox Signal*, 2009, 11 (4), 861

ДИФФУЗИЯ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ ХЛОРОПЛАСТОВ С УЧАСТИЕМ АКВАПОРИНОВ

Hydrogen peroxide diffusion via aquaporins through chloroplast envelope membrane

Мария МУБАРАКШИНА, Илья НАЙДОВ, Борис ИВАНОВ

Учреждение Российской академии наук Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Московская область, 142290, Россия;
E-mail: mubarakshinamm@gmail.com; Fax: +7-496-73-305-32

Пероксид водорода (H_2O_2) является одной из наиболее важных сигнальных молекул среди активных форм кислорода (АФК). Существенным фактором для осуществления ретроградного сигнала (сигнала от органеллы к ядру) является способность АФК диффундировать на длительные расстояния от места образования до места сигнализирования. Способность H_2O_2 диффундировать и механизм диффузии через мембраны хлоропластной оболочки были изучены в данной работе. Используя метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) и гидрофильную спиновую ловушку ROBN для регистрации гидроксильного радикала, генерируемого в H_2O_2 -зависимой реакции, нами было исследовано образование H_2O_2 в тилакоидах и хлоропластах на свету. Было найдено, что даже при низкой интенсивности света, молекулы H_2O_2 , образующиеся внутри хлоропластов, способны диффундировать через мембрану хлоропластов в цитоплазму, несмотря на работу антиоксидантных систем в строме. Также диффузия H_2O_2 была исследована с помощью конфокальной микроскопии с применением флуоресцентного красителя Amplex Red, при взаимодействии которого с H_2O_2 образуется флуоресцентный продукт резорруфин. Нам удалось зарегистрировать рост флуоресценции резорруфина вокруг хлоропластов в ответ на освещение, который полностью ингибировался в присутствии диурона, ингибитора фотосинтетического электронного транспорта. Для выяснения механизма диффузии H_2O_2 была исследована роль аквапоринов – белков, формирующих поры в хлоропластной мембране. Используя неспецифический ингибитор аквапоринов ацетазоламид (AZA), который химически связывается с определенными аминокислотными остатками белков аквапоринов, препятствуя, таким образом, прохождению воды через мембрану, было показано, что молекулы H_2O_2 диффундируют через оболочку хлоропласта с участием аквапоринов. Эти данные позволяют понять, как H_2O_2 , образующийся внутри хлоропластов, может являться сигнальной молекулой для осуществления ретроградного сигнала.

**ВЛИЯНИЕ БИКАРБОНАТА И ИНГИБИТОРОВ КАРБОНАНГИДРАЗЫ
НА СКОРОСТЬ ФОТОФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В ИЗОЛИРОВАННЫХ
ХЛОРОПЛАСТАХ ШПИНАТА**

**Effect of bicarbonate and carbonic anhydrase inhibitors on the rate
of photophosphorylation in isolated spinach chloroplasts**

Елена ОНОЙКО, Елена ЗОЛОТАРЁВА

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев, Украина;
E-mail: e.zolotareva@hotmail.com; тел./факс: (38044)2344041

Скорость фотофосфорилирования в хлоропластах высших растений зависит от содержания бикарбоната в среде и ускоряется при возрастании его концентрации в суспензии [1]. Известно также, что светозависимый протонный обмен в хлоропластах зависит от концентрации форм угольной кислоты и контролируется активностью карбоангидразы – фермента, катализирующего гидратацию углекислого газа и дегидратацию бикарбоната. В данной работе было изучена рН-зависимость влияния бикарбоната и ингибиторов карбоангидразы на скорость синтеза АТФ в изолированных хлоропластах шпината.

Хлоропласты класса „В” изолировали из листьев 40-дневных растений шпината (*Spinacea oleracea* L.) как описано ранее [2]. Концентрацию хлорофилла определяли по методу Арнона. Скорость фотофосфорилирования оценивали потенциометрическим и гексокиназным методом в диапазоне рН 6,5–8,2.

Показано, что экзогенно добавленный бикарбонат в концентрации 3–6 мМ эффективно ускоряет скорость фотофосфорилирования. Максимальная стимуляция наблюдалась при рН 7,0 и менее. По мере возрастания рН реакционной среды стимулирующее влияние HCO_3^- на скорость синтеза АТФ снижалось.

Стимуляция фотофосфорилирования бикарбонатом эффективно устранялась после непродолжительной (в течение 3-х минут) инкубации хлоропластов в присутствии ингибиторов карбоангидразы – гидрофильного ацетазоламида или липофильного этоксизоламида в концентрации 0,5 мМ. Эффект ингибиторов был наиболее заметен при рН 7,6: скорость синтеза АТФ, превышавшая в присутствии 6 мМ бикарбоната контрольную в 2,3 раза, после добавления ацетазоламида или этоксизоламида снижалась и составила 120 и 125% контрольного значения, соответственно.

Данные, полученные в настоящем исследовании, свидетельствуют в пользу того, что скорость фотофосфорилирования зависит не только от концентрации бикарбоната, но и от активности карбоангидразы, обеспечивающей быструю трансформацию форм угольной кислоты. Роль карбоангидразы заключается в сохранении достаточно высокой концентрации свободного бикарбоната, акцептирующего протоны в центрах их освобождения и ускоряющего, тем самым, их перенос.

1. Cohen W., MacPeck W. *Plant Physiol.*, 1980, 66 (2), 242.

2. Золотарева Е., Довбыш Е., Онойко Е., *Укр. Биохим. Журн.*, 2002, 73 (5), 61.

ИНДУКЦИЯ ЭНДОГЕННОГО РАЗОБЩЕНИЯ В ХЛОРОПЛАСТАХ: СИНЕРГИЗМ ДЕЙСТВИЯ АММОНИЙНЫХ КАТИОНОВ И СЖК

The induction of endogenous uncoupling in chloroplasts: synergetic action of ammonium cations and FFA

Вера ОПАНАСЕНКО

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Московская область,
142290, Россия;

E-mail: opanasenko@ibbp.psn.ru; opanasenko@hotmail.ru.

Действие субстратов и продуктов клеточного метаболизма на энергетику хлоропластов обычно исследуется индивидуально, в то время как в цитоплазме живой клетки эти вещества циркулируют одновременно. К таким метаболитам, в частности, относятся аммоний и свободные жирные кислоты. Содержание этих веществ в нативной клетке колеблется в зависимости от многих факторов. Аммоний поглощается из внешней среды и образуется из нитратов, он расходуется для синтеза аминокислот и азотистых оснований. Жирные кислоты продуцируются и катаболизируются при синтезе и гидролизе липидов в клетке, их количество и состав зависят от условий выращивания и возраста растений.

На хлоропластах высших растений довольно подробно исследовано влияние аммония и свободных жирных кислот на перенос электронов и синтез АТФ, однако изучение совместного действия этих метаболитов было начато лишь недавно [1,2]. Нами было показано, что на хлоропластах гороха наблюдается синергизм в действии пальмитиновой кислоты и аммония. В присутствии низких концентраций пальмитата и аммония происходит неаддитивное увеличение трансмембранной утечки ионов водорода (аммония) – ингибируется синтез АТФ, стимулируется базальный перенос электронов, снижается ΔN^+ – светоиндуцированное поглощение ионов водорода.

В настоящей работе показано, что стимулятором аммонийного разобщения, более эффективным, чем пальмитат (16:0), является стеариновая кислота (18:0). Миристиновая кислота, имеющая более короткую углеводородную цепь (14:0), оказалась гораздо менее эффективной, чем пальмитат и стеарат. Синергизм в разобщении с СЖК показан нами и для имидазола, но он не был найден при совместном действии СЖК и амфифильных аминов – метиламина, тетракаина, дибукаина и 9-аминоакридина.

Предполагается, что благодаря синергизму действия аммония и СЖК может осуществляться эндогенная регуляция сопряжения процессов трансформации энергии в тилакоидах хлоропластов. На основании данных о синергизме действия имидазола и СЖК можно предположить и возможность гормональной регуляции эндогенными аминами энергетического сопряжения в нативной растительной клетке.

1. Опанасенко В., Васюхина Л., *Биохимия*, 2009, 74(6), 791

2. Опанасенко В., Васюхина Л., Найдов И. *Биохимия*, 2010, 75(6), 887

ВЛИЯНИЯ ОПТИМИЗАЦИИ ПИТАНИЯ КУКУРУЗЫ ПРИ ЗАФОСФАЧИВАНИИ ПОЧВЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФОТОСИНТЕЗА

Яна ПОГРОМСКАЯ, Виктор ЗУЗА

Донецкая опытная станция Национальный научный центр «Институт почвоведения и агрохимии имени А.Н. Соколовского» Национальная академия аграрных наук Украины, ул. Садовая 16, п. Новгородское, г. Дзержинск, Донецкая обл., 85294, Украина
E-mail: joanar@mail.ru; Тел./факс: +38 (06247) 2-54-87.

При несбалансированном внесении удобрений неиспользованный фосфор накапливается в малодоступной для растений форме, вызывая зафосфачивание почвы. Избыток фосфора мешает поглощению других элементов питания, провоцирует функциональный дефицит азота [1] и нарушение синтеза хлорофилла. Поэтому изучение изменений в состоянии фотосинтетического аппарата при использовании различных технологических приемов возделывания на фоне зафосфачивания почвы имеет фундаментальное и прикладное значение.

Методом индукции флуоресценции хлорофилла с помощью хронофлуорометра «Флоратест» [2] нами изучено влияние на состояние фотосинтетического аппарата кукурузы сбалансирования питания по азоту и некорневой обработки микроэлементами и регуляторами роста в условиях зафосфачивания почвы. Абсолютные значения интенсивности флуоресценции зависят от концентрации хлорофилла а (Хла), поэтому измеренный сигнал нормировали на содержание Хл а в листе.

Установлено, что внесение азотных удобрений в почву уменьшает соотносительную к единице Хла интенсивность флуоресценции при открытых реакционных центрах (РЦ) F_0 на 38,6%, интенсивности Fj и FI, обусловленные количеством Q_b -невосстанавливающих фотосистемы 2 (ФСII) и эффективностью донорной части ФСII, на 40,3%, а флуоресценцию при закрытых РЦ (F_p) максимално, на 41,8%. Это говорит об увеличении оттока энергии на азотный обмен, о чем свидетельствует также и увеличение времени достижения F_p τ на 27%. Стимуляторы роста растений и некорневая подкормка микроэлементами без внесения азотных удобрений приводят к увеличению F_0 на 39,8 %, Fj и FI на 39,4%, F_p на 25,4%. Квантовый выход ФСII при этом снижается на 13,5%. Уменьшается поток электронов по ЭТЦ на этапе восстановления вторичного акцептора электронов пластохинона Q_b , повышая долю Q_b -невосстанавливающих ФСII в среднем на 18,2%. Эффективность фотоллиза снижается до 0,501 против 0,731 в контроле. Снижается τ на 33%. То есть, без снятия функциональный дефицит азота стимуляция и микроэлементная подкормка растений приводит к стрессовым изменениям в системе первичных процессов фотосинтеза и увеличению неизбирательных затрат энергии света.

1. Иванов А. Л. Фосфатный режим и превращение фосфорных удобрений в орошаемых светлых сероземах предгорной равнины Заилийского Алатау / Диссертация на соискание степени кандидата биологических наук. – Алма-Ата, 1984. – 153 с.

2. Галелюка І. Б. Портативний флуориметр для експрес-діагностики стану рослин: методи віртуального проектування і результати дослідного використання / І. Б. Галелюка, М. С. Качановська, Є. В. Саракан – Київ, 2006. – 53 с.

ВЛИЯНИЕ БУРОУГОЛЬНЫХ ГУМИНОВЫХ УДОБРЕНИЙ НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ *FESTUCA PRATENSIS HUDS*

The influence of the brown coal humic fertilizers
on photosynthetic system of *Festuca pratensis Huds*

Яна ПОГРОМСКАЯ¹, Ирина РЫКТОР²

¹Донецкая опытная станция Национальный научный центр «Институт почвоведения и агрохимии имени А.Н. Соколовского» Национальная академия аграрных наук Украины, ул. Садовая 16, п. Новгородское, г. Дзержинск, Донецкая обл., 85294, Украина

E-mail: joanap@mail.ru; Тел./факс: +38 (06247) 2-54-87.

²Донецкий национальный университет, Донецк, Украина

Одним из направлений оптимизации восстановления нарушенных экосистем является повышение адаптивных возможностей растений, используемых в фиторекультивации. Положительное влияние гуминовых препаратов (ГП) на антистрессовую устойчивость растений общеизвестно [1]. В связи с этим применение ГП в фиторекультивации имеет научно-практическую значимость. Нами установлено влияние на фотосинтетический аппарат овсяницы луговой (*Festuca pratensis Huds*) внесения бурогоугольных гуминовых удобрений (БГУ) [2] 2 г на 1 кг грунтосмеси из породы отвалов Авдеевского коксохимического завода и терриконита. Выявлено достоверное снижение содержания хлорофилла *a* (*hla*) на 2% и увеличение содержания хлорофилла *b* (*hlb*) на 1,6% и каротиноидов (*кар*) на 2% под действием БГУ, на фоне максимального прироста растительной массы при 25% терриконита в грунтосмеси. Внесение удобрений снижает величину отношения *hla/hlb* на 5%, уменьшает содержание хлорофилла коровых антенн реакционного центра (РЦ) на 40% и отношения *hPRC/кар* на 20%. Известно, что *hlb* и основная масса каротиноидов принадлежит светособирающему комплексу ССК. Приняв отношение *hlaССК/hlb* в ССК овсяницы постоянным при выращивании на грунтосмеси конкретного композиционного состава, показано следующее. Адаптивные перестройки пигмент-белковых комплексов фотосинтетического аппарата в крайне стрессовых условиях выращивания на грунтомесях пород коксохима и терриконов происходят путем увеличения доли хлорофилла ССК, *hlb* и каротиноидов на единицу содержания корового хлорофилла, а также увеличения доли *hlb* в ССК и снижения каротиноидов на единицу содержания хлорофилла ССК. Так как каротиноиды участвуют в диссипации избытка поглощенных квантов, а *hlb* более светочувствителен, чем *hla*, то можно полагать, что перестройка фотосинтетического аппарата направлена на повышение эффективности светопоглощения. Оптимизация же фотосинтетической системы овсяницы луговой под действием БГУ характеризуется повышением доли корового хлорофилла в поглощенном свете в процессе фотосинтеза.

1. Влияние гуминовых препаратов на антистрессовую устойчивость растений. Сообщение 1/ Ю.Н.Зубкова, И.А.Рыктор, А.Л.Антонова, А.В.Бутогин// Вісник ДонНУ, Сер. А: Природничі науки, 2009. - Вип. 1. - С. 593–597.

2. Заява на корисну модель 201013914 Україна, МПК А 01 В 79/02. Спосіб рекультивації сховищ відходів вуглезабагачення / О.В. Бутогін, М.Б. Узденніков, М.В. Гнеденко, Ю.М. Зубкова, В.В. Кирбаба; заявник і патентовласник Донецький національний університет (Україна); заявл. 22.11.2010 р.

**ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНОВ
НА АКЦЕПТОРНОЙ СТОРОНЕ ФОТОСИСТЕМЫ II**
The effect of heavy metal ions on electron transfer on acceptor side of photosystem II

Александр ПОЛИЩУК, Наталия ТОПЧИЙ, Владимир ПОДОРВАНОВ

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев, Украина;
E-mail: membrana@ukr.net; тел./факс: (38044)2723231

Изучено влияние ионов Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} и Hg^{2+} на кинетику реокисления Q_A^- и количество Q_B -невосстанавливающих центров ФСII с целью уточнения механизмов действия тяжелых металлов на процесс фотосинтетического переноса электронов между Q_A и Q_B . Хлоропласты изолировали из листьев 15-дневных проростков гороха. Модулированную флуоресценцию хлорофилла и величину трансмембранного ΔpH в хлоропластах с помощью липофильной pH-зависимой флуоресцентной метки 9-аминоакридина (9-AA) измеряли на флуориметре ХЕ-РАМ ("Walz", Германия).

Инкубация хлоропластов в присутствии 0,01–0,5 мМ Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} и Hg^{2+} приводит к подавлению поглощения протонов и снижению трансмембранного протонного градиента. При освещении листьев или хлоропластов, адаптированных к темноте, уровень флуоресценции, связанной с накоплением восстановленного первичного хинонового акцептора ФСII, Q_A^- , возрастает. Под действием интенсивного света в нарастающей флуоресценции отмечается несколько хорошо выраженных фаз, связанных с гетерогенностью акцепторной стороны ФСII. После выключения действующего света наблюдается многокомпонентный темновой спад флуоресценции, который отражает пути реокисления Q_A^- [1].

Времена полуспада и амплитуды компонент темновой релаксации флуоресценции хлорофилла сильно изменялись после добавления Me^{2+} . В контрольных хлоропластах времена полуспада быстрой, средней и медленной компонент составляли 282,50 мс, 1,71 с и 28,31 с, а их относительные вклады в флуоресценцию – 56,81%, 36,56% и 6,63% соответственно. В присутствии ионов Cu^{2+} , действующих подобно акцептору 2,6-ДХБХ, Fv/Fm снижался (Fv/Fm=0,58±0,01 при 50 мкМ по сравнению с контролем 0,65±0,01) из-за ускоренного реокисления Q_A^- ($t_{1/2\text{быстр}} = 148,27$, почти в 2 раза меньше по сравнению с контролем). В отличие от этого, ионы Hg^{2+} (5 мкМ) почти не влияли на реокисление Q_A^- , и, более того, в концентрации 20 мкМ лишь незначительно ускоряли быструю компоненту тушения флуоресценции, что сопровождалось незначительным изменением потенциального квантового выхода флуоресценции (Fv/Fm=0,64±0,05).

Ионы металлов в нашем исследовании разделяются на две группы: 1) Cu^{2+} и Hg^{2+} , и 2) Zn^{2+} , Pb^{2+} , и Cd^{2+} . Первые вызывали почти двукратное ускорение быстрой и промежуточной компонент, тогда как увеличение амплитуды быстрой фазы происходило за счет промежуточной и медленной компонент тушения флуоресценции. Ионы второй группы вызывали замедление быстрой и промежуточной компонент, при этом амплитуда медленной фазы увеличивалась, а промежуточной и быстрой фаз – уменьшалась. Данные указывают на облегчённое реокисление Q_A^- в присутствии ионов меди и, в меньшей степени, ртути, очевидно, в обход сайта Q_B и следующих за ним переносчиков. Таким образом, ионы этих металлов могут акцептировать электроны от Q_A^- .

1. Bukhov N.G., Egorova E., Krendeleva T. et al. // *Photosynth. Res.*, 2001, 70, 155.

**ПРЯМЫЕ МНОГОЧАСТИЧНЫЕ МОДЕЛИ ПРОЦЕССОВ
В ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ**
Direct multiparticle models of the processes in photosynthetic membrane

**Галина РИЗНИЧЕНКО, Илья КОВАЛЕНКО, Анна АБАТУРОВА,
Александра ДЬЯКОНОВА, Сергей ХРУЩЕВ, Дмитрий УСТИНИН,
Ольга КНЯЗЕВА¹, Евгений ГРАЧЕВ¹, Андрей РУБИН**

Биологический факультет Московского государственного университета
им. М.В.Ломоносова rznich@biophys.msu.ru

¹Физический факультет Московского государственного университета
им. М.В.Ломоносова

Разрабатываемый нами метод прямого многочастичного моделирования процессов в фотосинтетической мембране, позволяет интегрировать кинетические и структурные данные о процессах в сложном интерьере клетки. Многочастичная модель является компартментальной и представляет собой трехмерную сцену, в которую включены строма, мембраны тилакоида и люминальное пространство. Встроенные в мембрану мультиферментные белковые комплексы и мобильные переносчики электрона моделируются как отдельные объекты, расположенные в трехмерном пространстве. В моделях рассматриваются десятки-сотни объектов, каждый из них обладает набором свойств, таких как координаты, геометрическая форма и размеры, распределение заряда на поверхности, параметры взаимодействия с другими объектами, источником информации служит PDB и литература. Перенос электронов внутри комплексов описывается уравнениями для вероятностей состояний комплекса. Взаимодействие подвижных белков-переносчиков друг с другом и с мультиферментными комплексами моделируется уравнениями броуновской динамики для каждого из объектов, описывающими поступательное и вращательное движение под действием случайной броуновской силы и электростатическое взаимодействие. Параметры взаимодействия оцениваются из сравнения с экспериментальными кинетическими данными для взаимодействия молекул в растворе. Для дикого типа и мутантов изучены модели взаимодействия в растворе для Pс-cytf, Pс – PSI, PSI – Fd, Fd-FNR, а также модели взаимодействия в люмене для Pс-Cytf, Pс-PSI. Получены соответствующие экспериментальным зависимости скоростей реакций от ионной силы, ширины люминального пространства, заряда на мембране. Работа поддержана грантами РФФИ NN 11-04-01019, 11-04-01268.

1. Rubin A.B., G.Yu. Rznichenko. Models of primary processes in a photosynthetic membrane // *Advances in Photosynthesis and respiration*, 2009. V.29, p. 151-176

2. Kovalenko I.B., A.M. Abaturova, G.Yu. Rznichenko, A.B. Rubin. *Biosystems*, 2011. V.103, 180

3. Rznichenko G.Yu., I.B. Kovalenko, A.M. Abaturova, A.N. Diakonova, D.M. Ustinin, E.A. Grachev, A.B. Rubin. *Biophysical Reviews*, 2010. V.2(3), 101

4. Князева О.С., Коваленко И.Б., Абатурова А.М., Ризниченко Г.Ю., Грачев Е.А., Рубин А.Б. *Биофизика* 2010, 55 (2) 259

**УЧАСТИЕ КАРБОАНГИДРАЗ В ФОТОСИНТЕЗЕ *ARABIDOPSIS THALIANA*:
ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ КАРБОАНГИДРАЗ, ВЛИЯНИЕ CO₂,
НОКАУТ КАРБОАНГИДРАЗНЫХ ГЕНОВ**

**The participation of carbonic anhydrases in *Arabidopsis thaliana* photosynthesis:
carbonic anhydrase genes expression, CO₂ effect, carbonic anhydrase genes knockout**

**РУДЕНКО Н.Н.¹, ИГНАТОВА Л.К.¹, ФЕДОРЧУК Т.П.¹, СЕМЕНОВА Г.А.²,
ИВАНОВ Б.Н.¹**

¹Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Московская область, 142290, Россия;

E-mail: rudenko_n@rambler.ru; Fax: +7-4967-33-05-32;

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская область, 142290, Россия

Карбоангидразы (КА) – группа ферментов, катализирующих обратимую реакцию гидратации углекислого газа. КА составляют по массе от 1 до 2% всего растворимого белка клетки растения. В литературе имеются предположения об их роли в реакциях фотосинтетического электронного транспорта и фиксации неорганического углерода, однако ни одна из гипотез не получила прямого экспериментального подтверждения. В геноме арабидопсиса обнаружено 8 генов, кодирующих α -КА и 6 генов, кодирующих β -КА. Нами была проведена работа по выявлению генов, которые экспрессируются в листьях и установлению тех КА, которые могут принимать участие в фотосинтезе. Методом кПЦР был определен уровень экспрессии КА генов в зависимости от концентрации CO₂ в атмосфере при выращивании.

Впервые было показано, что в листьях арабидопсиса экспрессировались 13 α - и β -КА (т.е. все, кроме гена, кодирующего α -КА3), и уровень их экспрессии существенно различался. Экспрессия 11 генов КА зависела от концентрации CO₂ в атмосфере. Уровень экспрессии генов большинства КА был выше у растений 20-дневного возраста, выращенных при пониженной концентрации CO₂ (150 ppm), чем у растений того же возраста, выращенных при повышенной концентрации CO₂ (700 ppm). У 26-дневных растений этот эффект был еще более выраженным (в 12 раз выше у β -КА3, в 23 раза у β -КА5, в 19 раз – у α -КА2 и в 154 раза – у α -КА6).

При использовании мутантных растений арабидопсиса с нокаутированными генами КА обнаружено различие в величине квантового выхода флуоресценции хлорофилла - на 23% меньше у нокаутов по гену α -КА4 (обнаруженному ранее среди белков тилакоидных мембран [1]), по сравнению с таковым у растений дикого типа. Коэффициент нефотохимического тушения (NPQ) был на 15% и на 28%, а величина Rfd, характеризующая «net»-фотосинтез – на 15% и на 24%, ниже у α -КА2 и β -КА2 нокаутов, соответственно, чем в растениях дикого типа. С помощью электронной микроскопии были выявлены различия в метаболизме мутантов, нокаутированных по генам α -КА4, β -КА1 и β -КА4.

Таким образом, зависимость экспрессии большинства генов КА, также как и изменения параметров фотосинтеза и структуры клеток листьев мутантов, нокаутированных по КА генам, указывает на возможность непосредственного или опосредованного участия в фотосинтезе большинства карбоангидраз α - и β -семейств.

1. Friso G., Giacomelli L., Ytterberg A.J., Peltier J.-B., Rudella A., Sun Q., van Wijk K.J., The Plant Cell, 2004, 16, 478–499.

ФОТОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ХЛОРОПЛАСТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ГЕНОТИПОВ ЯЧМЕНЯ, ПОДВЕРГНУТЫХ ЗАСУХЕ

Photochemical activity of chloroplasts isolated from barley genotypes affected by drought

Самира РУСТАМОВА¹, Масма НАСРУЛЛАЕВА², Сафтар СУЛЕЙМАНОВ¹, Ирада ГУСЕЙНОВА¹

¹Институт ботаники НАН Азербайджана, Баку AZ 1073, Азербайджан;
E-mail: babaliyevsamira@mail.ru; Тел: (994-12) 438 1164; Факс: (994-12) 510 2433

²Институт генетических ресурсов НАН Азербайджана

В опытах использовали генотипы ячменя, различающиеся по засухоустойчивости и другим физиологическим параметрам: среднеустойчивые – Карабах-7, Паллидум-596, Нутанс (сорт местной селекции) и высокоустойчивый – Паллидум К-2778. Растения были взяты из экспериментальной базы Института генетических ресурсов (Баку, Азербайджан). Генотипы были выращены в полевых условиях при нормальном водообеспечении и в условиях почвенной засухи. Фотохимическую активность хлоропластов, изолированных из контрольных и подвергнутых стрессу растений, определяли полярографическим методом в замкнутой амперометрической ячейке с платиновым электродом типа Кларка по поглощению или выделению кислорода. При сравнительном исследовании различных генотипов ячменя обнаружены существенные различия в функциональной активности фотосинтетического аппарата на уровне фотохимических реакций хлоропластов. В экспериментах высокая активность ФС II (скорость выделения кислорода) в орошаемых растениях была обнаружена у Паллидум-596, тогда как самое низкое значение у Паллидум-К 2778. Активность ФС II у всех подвергнутых стрессу растений была ниже по сравнению с контрольными растениями. У растений Карабах-7 активность ФС II значительно затрагивается обезвоживанием – составляет 35% от значения контроля. Однако в листьях подвергнутого засухе высокоустойчивого генотипа Паллидум-К 2778 фотохимическая активность ФС II составляет приблизительно 56% от такового значения у контроля. У генотипов Паллидум-596 и Нутанс активность ФС II при засухе составляет соответственно 45% и 50% от значения контроля. Активность ФС I (скорость поглощения кислорода) затрагивается незначительно при засухе. У всех генотипов активность ФС I остается на уровне контроля. Исключение составляет генотип Карабах-7, где снижение активности ФС I при засухе составляет 71% от контрольного значения. Видимо, фотосинтетический аппарат у генотипа Карабах-7 наиболее чувствителен к дефициту воды.

ИЗМЕНЕНИЯ ПИГМЕНТНОГО СОСТАВА И ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ФСА *EPHEDRA MONOSPERMA* ПРИ ФОТОАДАПТАЦИИ
Changes in the pigment composition and condition of photosynthetic apparatus of *Ephedra monosperma* during photoadaptation

Валентина СОФРОНОВА

Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, Якутск, 677980, Россия;
E-mail: vse07_53@mail.ru; Fax: +7-411-23-358-12;

В побегах вечнозеленых растений *Ephedra monosperma* из семейства *Ephedraceae* обнаружен альтернативный путь превращения зеаксантина (Зеа) – его окисление с образованием вторичного ретрокетокаротиноида родоксантина (Rhd) [1]. Установлено, что он локализуется в паренхимных клетках под эпидермой с солнечной стороны, убывая и исчезая в теневой части среза побега. В летние месяцы в активно ассимилирующих побегах Rhd отсутствует. Его появление отмечается в начале сентября и по времени совпадает с началом снижения хлорофиллов (Хл) и β -каротина (β -Кар), увеличением доли ксантофиллов (Ксант) в пуле желтых пигментов. В начале осени при прекращении активных ростовых процессов достижение фотостаза через адаптивное снижение Хл начинается на ранней стадии необратимого фотоингибирования задолго до закаливания растения низкими положительными температурами. Снижение Хл практически завершается в начале второй фазы закаливания. Накопление Rhd в побегах сопровождает этот процесс. В течение первой фазы закаливания его содержание нарастало от следовых до 19,6 мкг/г сухой массы ($3,8 \pm 1,2\%$ от суммы каротиноидов – Кар). Его максимальная концентрация ($59,9 \pm 16,3$ мкг/г сухой массы или $10,8 \pm 2,9\%$ от суммы Кар) в побегах достигалась в начале второй фазы закаливания после 3–5 дней при установлении устойчивых отрицательных температур. В последующие зимние и весенние месяцы до начала активных ростовых процессов уровень Rhd остается практически постоянным.

К концу сентября после прохождения недельного закаливания низкими положительными температурами необратимое и обратимое фотоингибирование составили 17,9 и 9,1% по отношению к летнему максимальному значению F_v/F_m . За этот период температуры были равны $3,6 \pm 1,2$, $2,3 \pm 0,8$, $1,0 \pm 1,3^\circ\text{C}$ в светлое время суток, за сутки, в ночное время соответственно. К началу достижения максимума содержания Rhd при наступлении устойчивых слабых морозов ($-3,8 - -5,6^\circ\text{C}$ в среднем за сутки) необратимое фотоингибирование возрастало до 27,2%, обратимое до 15,7%. После двухнедельного воздействия этих температур обратимое фотоингибирование достигало максимальных значений 26,6–27,1% в результате тушения параметров F_o и F_m с участием пигментов виолаксантинового цикла (ВЦ). В дальнейшем его глубина практически оставалась постоянной и не зависела от дальнейшего снижения температур до $-40 - -45^\circ\text{C}$ в зимние месяцы. Необратимое фотоингибирование достигало максимальных значений (47,8 – 52,7 %) при $-12,4 - -15,6^\circ\text{C}$. По-видимому, Ксант усиливают различные способы нефотохимического тушения Хл, в то время образование Rhd происходит в результате трансформации хлоропластов в нефотосинтезирующие хромопласты.

1. Bouvier F, Backhaus R.A., Camara B., J. Biol. Chem., 1998, 273 (46), 30651

**ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ЭЛЕКТРОННЫХ ПОТОКОВ
В ТИЛАКОИДНЫХ МЕМБРАНАХ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА**
Possible mechanisms of electron flows regulation in thylakoid membranes under stress

Ирина СТРИЖ, Татьяна ЖИГАЛОВА

Биологический факультет Московского государственного университета
им.М.В.Ломоносова, Ленинские горы д.1, кор.12, г. Москва, 119991, Россия
E-mail: irina.strizh@mail.ru; Факс.: (495)939-43-09

Работа электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) фотосинтеза является одним из ключевых факторов, определяющих функционирование множества метаболических процессов и редокс состояние всей растительной клетки. Перераспределение электронных потоков в ЭТЦ играет важную роль в регуляции метаболизма углерода, азота и серы, а также является источником регуляторных редокс сигналов. Одним из альтернативных акцепторов электронов в ЭТЦ является кислород. Фотовосстановление O_2 значительно активируется при стрессах, причем образование активных форм кислорода может приводить как к программируемой гибели клеток, так и к инициации адаптивных реакций [1]. Акцепторная сторона фотосистемы (ФС) I, традиционно, считается основным местом сброса электронов на O_2 [2], однако в последние годы появляется все больше данных, свидетельствующих о возможности фотозависимого образования H_2O_2 на уровне пула пластохинонов [3]. Ранее, по результатам ряда независимых экспериментов, проводимых на растениях, выращиваемых в условиях различных абиотических стрессов, мы предположили, что одним из факторов устойчивости растений может являться перераспределение потоков электронов в ЭТЦ хлоропластов, а именно снижение интенсивности фотовосстановления O_2 на уровне ФС I и активация фотообразования H_2O_2 [4]. Принципиально важным вопросом является выяснение механизмов регуляции перераспределения потоков электронов в ЭТЦ. Изменение состояния тилакоидных мембран, показанное ранее в условиях засухи, может быть одним из факторов, регулирующих поток электронов в ЭТЦ. Состояние тилакоидных мембран может регулироваться внутренними регуляторными молекулами гормональной природы. Салициловая кислота (СК), жасмоновая кислота (ЖК) и абсцизовая кислота (АБК) являются хорошо известными стресс-гормонами, инициирующими защитные функции растения и влияющими на состояние мембран. Важно, что начальные этапы биосинтеза этих фитогормонов осуществляются в хлоропластах, а синтез ЖК, сопровождающийся изменением состояния тилакоидных мембран, может быть индуцирован как раневым стрессом, так и действием СК. В серии экспериментов по обработке проростков пшеницы разного возраста СК, АБК и детергентом Tween-20 мы получили результаты, позволяющие говорить о том, что как абиотические стрессы, так и экзогенная обработка растений соединениями, изменяющими состояние мембран, приводит к изменению работы ЭТЦ тилакоидов, в том числе и к перераспределению электронного потока на кислород.

1. Foyer C.H., Noctor G. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2009, 11, 861
2. Asada K., *Plant Physiology*, 2006, 141, 391
3. Mubarakshina M.M., Ivanov B.N., *Physiologia Plantarum*, 2010, 140, 103
4. Strizh I., *Photosynthesis. Energy from the Sun*. Springer, 2008, 1349

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ ИНФИЦИРОВАННЫХ НАНОВИРУСАМИ
Evaluation of the functional state of photosynthetic apparatus of nanovirus-infected legumes

Наргиз СУЛТАНОВА, Ирада ГУСЕЙНОВА

Институт ботаники НАН Азербайджана, Баку, Патамдарское шоссе, 40, AZ1073;
E-mail: nargizsultanova@rambler.ru; Fax: +994-12-510-2433

Среди широко распространенных и вредоносных вирусных болезней растений следует особенно отметить некроз бобовых растений, вызываемый нановирусами. Нановирусы вызывают появление негодных плодов, ухудшение их качества, хлорозов и снижение урожайности. Изучение механизмов ответной реакции растений на вирусные заражения представляется актуальным, поскольку оно дополнит недостающие знания о фитопатогенах и позволит разработать более эффективные меры борьбы с инфекцией. Установлено, что уровень устойчивости растений к фитозаболеваниям обеспечивается многими физиолого-биохимическими показателями, отвечающими за сохранение жизнеспособности и перестройку метаболизма растений в стрессовых условиях. В данной работе представлены результаты изучения квантового выхода ФС II (F_v/F_m), активности ФС I и ФС II, количество белков, каротиноидов и содержания хлорофиллов а и б в листьях бобовых растений, инфицированных нановирусами. Образцы *Vicia faba* L. с потенциальными признаками нановирусного заболевания, а также не пораженные этим вирусом, были собраны из разных регионов Азербайджана, в том числе из Гейчай, Масаллы и Исмаиллы летом 2009-2010 гг. В качестве контрольного варианта были взяты не зараженные растения, выращенные в идентичных условиях. В результате наших исследований были установлены изменения потенциального квантового выхода ФС II (отношения F_v/F_m) и фотохимической активности ФС I и ФС II под влиянием вирусной инфекции. Активность электронного транспорта у всех подвергнутых стрессу растений была ниже, чем у контрольных растений. Фотохимическая эффективность ФС II (отношения F_v/F_m) в стрессовом варианте снижалась, составляя $F_v/F_m=0,52$, относительно контрольного варианта, где эффективность ФС II была равна $F_v/F_m=0,72$. Обнаружены также существенные различия на уровне фотохимических реакций хлоропластов. Активность ФС II также значительно затрагивается патогенезом, составляя 43% от значения контроля, а в активности ФС I существенных различий не наблюдалось. В контрольном варианте содержание хлорофиллов увеличивалось до максимального значения по сравнению со стрессовым вариантом, а в содержании каротиноидов особых изменений не наблюдалось. Количество растворимых белков в пораженных листьях снижается.

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ВАРИАБЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА НА ФОТОСИНТЕЗ ВЫСШЕГО РАСТЕНИЯ

Analysis of variation potential influence on photosynthesis in a higher plant

Владимир СУХОВ, Сергей МЫСЯГИН, Владимир НЕРУШ, Владимир ВОДЕНЕЕВ

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, 60350, Россия;
E-mail: vssuh@mail.ru; Тел.: +7-831-465-61-06; Факс: +7-831-462-30-85

Распространяющиеся электрические сигналы, представленные у высших растений потенциалом действия (ПД) и варибельным потенциалом (ВП), играют важную роль в формировании ответа растительного организма на действие факторов внешней среды. Показано, что ПД и ВП влияют на экспрессию ряда генов, синтез фитогормонов, процессы флоэмного транспорта, дыхание и фотосинтез. Данные о вызванных электрическими сигналами ответах фотосинтетического аппарата достаточно противоречивы, большинство работ показывает факт быстрой инактивации фотосинтетических процессов, индуцированной ПД и ВП. Механизмы, лежащие в основе такой инактивации у высших растений остаются в настоящее время до конца не изученными; существует гипотеза о том, что в их основе лежит снижение активности цикла Кальвина, влияющее, в свою очередь, на процессы световой стадии. Целью настоящей работы стал анализ таких механизмов у герани.

Объектом исследования служила герань (*Pelargonium zonale*), выращенная на почве в комнатных условиях. Для исследования световой стадии фотосинтеза использовали РАМ-флуориметр Dual-РАМ-100, позволяющий измерять основные параметры фотосистем I и II. Для исследования газообмена и транспирации использовали газоанализатор GFS-3000. Электрофизиологические измерения осуществляли экстраклеточно на стандартной электрофизиологической установке, с выходом на ПК. Измерения биопотенциалов, параметров световой и темновой стадии проводили одновременно с одного листа. ВП индуцировали ожогом (3–4 с) другого листа растения.

Показано, что ожог вызывает распространение ВП, который проходит в исследуемый лист и индуцирует в нем инактивацию фотосинтетических процессов (уменьшение квантового выхода фотосистем I и II, qP , ассимиляции CO_2 и транспирации и увеличение qN и квантовых выходов потерь, связанных с ограничением донорной и акцепторной стороны фотосистемы I). В условиях низкой концентрации CO_2 (15 мкл л^{-1}) и слабой освещенности (отсутствие актиничного света) наблюдается существенное подавление большинства вызванных ВП изменений показателей световой стадии, что подтверждает ключевую роль инактивации цикла Кальвина в развитии индуцированных электрическими сигналами ответов фотосинтетического аппарата. В то же время, вызванное ВП возрастание потерь, связанных с ограничениями ухода электронов с акцепторной стороны фотосистемы I, не зависит от условий эксперимента, что показывает существование альтернативного пути влияния электрических сигналов на световую стадию фотосинтеза.

**КАРОТИНОИДЫ И ПИГМЕНТ-БЕЛКОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЛИСТЬЕВ
DESCHAMPSIA ANTARCTICA DESV. В УСЛОВИЯХ УФ-В ИЗЛУЧЕНИЯ**
Carotenoids and pigment-protein complexes in leaves
of *Deschampsia antarctica* Desv. plants under conditions of UV-B radiation

Наталья ТАРАН, Александр ОКАНЕНКО, Владимир СТОРОЖЕНКО,
Наталья СВЕТЛОВА

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко 01033, Киев, Украина
E-mail: tarantul@univ.kiev.ua; тел./факс: (38044) 5221427

Растения *Deschampsia antarctica* Desv. естественно адаптированы к антарктическому климату и высоким уровням ультрафиолетового излучения (УФ-В). Фотосинтетический аппарат этих растений аппарата способен функционировать при 0°C со скоростью, составляющей 30%.

В работе исследовалось влияние УФ-В излучения на пигментный состав и количество пигмент-белковых комплексов в листьях растений *D. antarctica*. Показано, что УФ-В облучение растений приводило, к деградации хлорофилла (Хл) и β-каротина, причем содержание ксантофиллов не изменялось. Под действием УФ-В облучения снижалось содержание Хл *a* и *b*, β и β-каротина. В то же время соотношения содержания Хл *a/b*, содержание лютеина + зеаксантина (Lu + Zea), виолаксантина (Vio) и неоксантина (Neo), также общее содержание каротиноидов (Кар) не изменялись. Эти данные позволяют предполагать, что каротиноиды принимают участие в защите фотосинтетического аппарата от разрушения УФ-В излучением.

Важной характеристикой пигментного комплекса является соотношение Хл/Кар, величина которого, как известно, зависит от условий освещения растений. Под воздействием УФ-В излучения молярное соотношение Хл/Кар снижалось по сравнению с контролем.

У растений под влиянием УФ-В облучения содержание Хл в пигмент-белковых комплексах фотосистемы I (CP1a + CP1) возрастало на 22%, а в комплексах реакционного центра ФС II – снижалось на 34%. Относительное количество олигомерных (LHCP1) и мономерных (LHCP3) форм в условиях стресса не изменялось. Относительное количество основного светособирающего Хл-*a/b*-белкового комплекса LHCP была одинаковой в контрольных и УФ-В облученных растениях.

Мы получили экспериментальные результаты, которые свидетельствуют о деградации β-каротина в пуле каротиноидов листьев облученных растений. β-каротин локализуется в антенне и реакционных центрах (РЦ) ФС II. В то же время, содержание Хл снижалось в комплексах реакционного центра ФС II реакционного центра. Наши данные подтверждают, что ФС II является частью фотосинтетического аппарата, наиболее восприимчивой к повреждающему действию УФ-В излучения. Тушение триплетного состояния первичного донора ($^3P_{680}$) и раскисление окисленной формы (P_{680}^+) играют важную роль в защите растений от фотоингибирования. Синглетный кислород (1O_2) и триплетные возбужденные состояния хлорофилла ($^3Chl^*$) также дезактивируются β-каротином. По нашему мнению, возрастание содержания 1O_2 приводит к разрушению молекул β-каротина в листьях растений *D. antarctica* под воздействием УФ-В излучения.

**ВЫСОКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФОТОСИНТЕЗА МОЖЕТ БЫТЬ ДОСТИГНУТА
У МУТАНТНЫХ РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ *CHLORINA* 3613
С ЗАБЛОКИРОВАННЫМ БИОСИНТЕЗОМ ХЛОРОФИЛЛА *b*
High efficiency of photosynthesis can be achieved
in chlorophyll *b*-less barley mutant *chlorina* 3613**

Е.В. ТЮТЕРЕВА, А.Н. ИВАНОВА, И.Ю. ЖЕЛНИНСКАЯ, О.В. ВОЙЦЕХОВСКАЯ

Komarov Botanical Institute, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia
E-mail: ovoitse@yandex.ru; tuterlena@mail.ru; Fax: +7 812 346 3643

Растения мутанта ячменя с заблокированным синтезом хлорофилла *b* *chlorina* 3613, выращиваемые в открытом грунте, затеняли марлевыми пологами до $800 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$, что составляло 40% от полуденного уровня ФАР $2000\text{--}2500 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$, на стадии «кущения – выхода в трубку» на период 7 дней. По истечении 7 дней затенение снимали. У затененных растений *chlorina* 3613, наряду с изменением цветности надземных органов с желто-зеленой на насыщенно-зеленую, значительно изменились ультраструктура хлоропластов, морфометрические параметры побегов, вегетативная мощность и семенная продуктивность по сравнению с контрольными растениями *chlorina* 3613, не подвергавшимися затенению. После снятия затеняющих пологов было обнаружено, что содержание хлорофилла *a* в листьях мутанта возросло вдвое, а интенсивность ассимиляции CO_2 увеличилась в три раза, однако, восстановления биосинтеза хлорофилла *b* в этих условиях не происходило. Высокая интенсивность ассимиляции CO_2 экспериментальной группы растений сохранялась вплоть до конца вегетации. Эксперимент был проведен в 2006 г. и воспроизведен в 2007 г., но в последующем прохладном и облачном 2008 г. не дал вышеописанного эффекта, что указывает на узость необходимых для его воспроизведения диапазонов температурных и световых условий. Нами были изучены динамика основных белков ССК и фотосистем в ходе эксперимента методом вестерн-блоттинга. В докладе обсуждается влияние периода затенения на восстановление структуры хлоропластов и функционирования фотосинтетического аппарата растений *chlorina* 3613.

**КАРБОАНГИДРАЗЫ, РАСПОЛОЖЕННЫЕ ВБЛИЗИ ФС1 В ТИЛАКОИДАХ
ARABIDOPSIS THALIANA: ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА**
**Carbonic anhydrases located near PS1 in thylakoids of *Arabidopsis thaliana*:
isolation and properties**

ФЕДОРЧУК Т.П., РУДЕНКО Н.Н., ИГНАТОВА Л.К., ИВАНОВ Б.Н.

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Московская область,
142290, Россия;
E-mail: fedor4uktp@inbox.ru; Fax: +7-4967-33-05-32.

Карбоангидраза – фермент, катализирующий обратимую гидратацию углекислого газа с образованием ионов бикарбоната и протонов. Его многочисленные формы обнаружены в клетках всех живых организмах от прокариот до человека, что объясняется участием компонентов катализируемой реакции во многих метаболических и сигнальных процессах. В наших работах и в работах других ученых получены данные, свидетельствующие о наличии в тилакоидах хлоропластов высших растений нескольких носителей карбоангидразной активности. Природа этих носителей, как и их местоположения до сих пор точно не установлены. Предыдущие исследования показали при этом, что большая часть этих носителей имеют белковую природу, хотя не ясно, представителями, какого из известных семейств этого фермента они являются.

В настоящей работе была исследована природа карбоангидразной активности участков тилакоидной мембраны, содержащих, в основном, пигмент-белковые комплексы фотосистемы 1 (ФС1). Препараты, тилакоидных мембран, обогащенные ФС1, были обработаны детергентом и сорбированы на ионообменной колонке. При элюировании сорбированного материала буфером с увеличивающейся концентрацией NaCl и проведении анализа карбоангидразной активности фракций было обнаружено, что эта активность «выходит» двумя пиками, – при концентрации соли 100–300 мМ (низкосолевая фракция) и 450–550 мМ (высокосолевая фракция).

После предварительной очистки белков этих фракций путем осаждения ацетоном, центрифугирования и солюбилизации осадков, была проведена их аффинная хроматография на агарозе с пришитым мафенидом (специфическим ингибитором карбоангидраз). Нативный электрофорез специфически связавшихся белков (после освобождения от элюирующего растворимого ингибитора) выявил, что носители карбоангидразной активности разных фракций имеют низкую молекулярную массу, но разную электрофоретическую подвижность. Это соответствует нашим предыдущим данным, полученным другими методами, позволявшим предполагать, что в тилакоидных мембранах содержатся два низкомолекулярных белка, обладающих карбоангидразной активностью. С целью проверки этого предположения проведен денатурирующий электрофорез элюатов, полученных при аффинной хроматографии низкосолевого и высокосолевого фракций, и исследовано действие специфических ингибиторов карбоангидраз, – ацетазоламида и этоксизоламида, – на карбоангидразную активность этих элюатов.

**КВАНТОВЫЙ ВЫХОД ФОТОДЕСТРУКЦИИ P700⁺ В КОМПЛЕКСАХ
ФОТОСИСТЕМЫ 1, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ЦИАНОБАКТЕРИИ A. PLATENSIS**
**Quantum yield of P700⁺ photodestruction in isolated Photosystem I complexes
of the cyanobacterium *A. platensis***

Владимир ШУБИН, Ирина ТЕРЕХОВА, Навасард КАРАПЕТЯН

Институт биохимии им АН Баха РАН, Москва, 119171, Россия;
E-mail: shubin@inbi.ras.ru; Fax: +7-495-95-427-32;

С целью выяснения возможности выполнения катион радикалом P700 (P700⁺) функции диссипации избыточной энергии возбуждения определяли квантовый выход фотодеструкции P700⁺ при селективном лазерном облучении в полосе поглощения катион радикала (810 и 870 нм) и антенного хлорофилла (650 нм) у изолированных комплексов фотосистемы 1 (ФС1). О фотодеструкции катион радикала судили по убыли концентрации активного P700. Так как кинетика фотодеструкции многокомпонентна, расчет интегральных квантовых выходов проводили для тех доз облучения, при которых наблюдалось 20% падение концентрации P700. Во всех экспериментах величина квантового выхода фотодеструкции P700⁺ оказалась менее $0,7-1,4 \times 10^{-8}$ [1]. Расчеты показывают, что эта величина достаточна для защиты примерно 80–90% хлорофилла ФС1 от фотодеструкции при экспозиции растений на солнечном свете в течение дня.

При лазерном облучении в области поглощения антенного хлорофилла (650 нм) величина квантового выхода фотоинактивации P700 практически не изменялась (3×10^{-8}), тогда как квантовый выход фотодеструкции антенного хлорофилла был почти три порядка больше ($6-7 \times 10^{-6}$). Выцветание хлорофилла при всех трех используемых длинах волн облучения происходило почти синхронно с уменьшением концентрации активного P700, что также указывает на возможную защитную роль P700⁺ [1].

Другим кандидатом на роль центров диссипации избыточной энергии возбуждения могли быть длинноволновые формы хлорофилла (Хл-710 и Хл-735 для *Arthrospira platensis*). Все описанные выше измерения проводили как на мономерных (содержащих только Хл-710) так и на тримерных комплексах ФС1 (содержащих Хл-710 и Хл-735). Отсутствие заметной разницы в кинетике выцветания свидетельствует о том, что Хл-735 не играет существенной роли в защите антенного хлорофилла от фотовыцветания. Можно лишь отметить, что в обоих типах комплексов наблюдалось более быстрое выцветание формы Хл-710 по сравнению с основным антенным Хл. Таким образом, первичный донор электрона P700 в окисленной форме может выполнять важную функцию – тушение избыточной энергии возбуждения [1].

1. Shubin V.V., Terekhova I.V., Kirillov B., Karapetyan N.V. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2008, 7, 956

Секция 3

ФОТОРЕЦЕПТОРЫ

**РЕТИНАЛЬ-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КАК ФАКТОР,
ПРЕДОТВРАЩАЮЩИЙ ФОТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ РЕТИНАЛЯ
В СЕТЧАТКЕ ГЛАЗА**

Retinal-protein interactions as the factor preventing retinal phototoxic effect in retina

**АБОЛТИН П.В., ШЕВЧЕНКО Т.Ф., ЛЕВИН П.П., ШУМАЕВ К.Б.,
КАЛАМКАРОВ Г.Р.**

Учреждение Российской академии наук Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4, Россия
E-mail: tatianashevchenko@rambler.ru, FAX: (495) 137 41 01

Фотоповреждение является одной из причин нейродегенеративных изменений в сетчатке и пигментном эпителии глаза и одним из факторов риска развития возрастной макулярной дегенерации. Одним из источников фотоокисления в фоторецепторах и пигментном эпителии является ретиналь и его производные. Хотя ретиналь и является фототоксическим соединением, но в свободной форме он не встречается в сетчатке, а ретинол или Шиффовы основания ретиналя фототоксическими соединениями не являются. Однако ретиналь (альдегид) в значительных концентрациях при высоких освещенностях может находиться в связанном состоянии с родопсином или с ретиналь-связывающими белками. Целью данной работы было выяснить, насколько связанный с белками ретиналь может быть фототоксическим.

Генерацию супероксидного и гидроксильного радикалов детектировали с помощью спиновой ловушки ДЕПМПО (5-(диэтоксифосфорил)-5-метил-1-пролин N-оксид). Образование триплетного возбужденного состояния исследовали методом лазерного флеш-фотолиза. Апоптоз сетчатки выявляли методами TUNEL и специфической деградации ДНК.

Показано, что связывание ретиналя и его производных со специфическим ретиналь-связывающим белком, альбумином и родопсином приводит к существенному снижению квантового выхода генерации супероксида и гидроксильного радикала. Квантовый выход образования синглетного кислорода и время жизни возбужденного триплетного состояния также существенно снижались. Таким образом, мы предполагаем, что связывание ретиналя с ретиналь-связывающим белком играет важную роль в защите элементов сетчатки от фотоиндуцированного апоптоза. Возможно, нарушение этих взаимодействий является одной из причин развития возрастной макулярной дегенерации.

**ФОТОРЕЦЕПТОРНЫЙ КОМПЛЕКС *NEUROSPORA CRASSA*
И ЗАЩИТА КЛЕТКИ ОТ АФК**
Neurospora crassa photoreceptor complex and cell defense from ROS

Татьяна БЕЛОЗЕРСКАЯ, Наталья ГЕССЛЕР, Елена ИСАКОВА, Юлия ДЕРЯБИНА

Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва, Россия
E-mail: tab@inbi.ras.ru

У *N. crassa* свет сине-фиолетовой области спектра запускает формирование репродуктивных структур, синтез каротиноидных пигментов, сдвиг фазы циркадного спороношения и др. Для реализации фотоответов у *N. crassa* необходимо присутствие PAS-домен-содержащих полипептидов WHITE COLLAR 1 и WHITE COLLAR 2, образующих гетеродимерный фоторецепторный комплекс WCC (white collar complex). Полипептид WC-1 содержит LOV-домен, связывающий ФАД, и выполняет в комплексе WCC фоторецепторную функцию, а WC-2 – стабилизирующую. Присутствие в белках WC-1 и WC-2 «цинковых пальцев», т.е. мотивов узнавания GATA-последовательностей в составе промотора, дает основание рассматривать их как вероятные факторы транскрипции. Полипептиды WC-1 и WC-2 являются продуктами генов white collar-1 (*wc-1*) и white collar-2 (*wc-2*). Мутации по любому из этих генов ингибируют все ответы организма на действие света сине-фиолетовой области спектра [1]. Антиоксиданты и Cu,Zn-СОД, которые участвуют в регуляции уровня АФК, оказывают влияние на трансдукцию сигнала света через комплекс WCC [2].

В условиях действия стрессорных факторов (экспозиция на воздухе, освещение, добавление менадиона, повышение температуры) наблюдалось повышение активности СОД у дикого типа *N. crassa*, но не у мутантов *wc-1* и *wc-2*. При добавлении менадиона в среду культивирования (1мМ, 1 ч) количество карбонильных групп в белках дикого типа увеличивалось, но не изменялось у мутантов по WCC. При экспозиции на воздухе у штамма дикого типа выявлено образование S-S связей в белках, возраставшее под действием света. У WCC мутантов образование S-S связей в белках происходило медленнее и не зависело от света. Таким образом, действие стрессоров у дикого типа сопровождалось активацией СОД, увеличением карбонильных групп в белках, образованием S-S-связей в белках, не наблюдавшиеся у WCC мутантов. Ответные реакции на действие стрессорных факторов свидетельствовали о внутриклеточном повышении АФК у дикого типа.

У мутантов по фоторецепторному комплексу выявлено повышение активности каталазы по достижении ими стационарной стадии роста; активность каталазы значительно возрастала при действии стрессорных факторов (тепло, добавление H_2O_2). Анализ дыхательной активности штаммов *N. crassa* показал, что при окислении глюкозы в клетках мутантов активируется KCN резистентный путь дыхания, и его вклад в общее дыхание клеток был выше, чем у дикого типа. Полученные данные свидетельствуют об устойчивости WCC мутантов к окислительному стрессу и показывают, что наличие WCC обеспечивает в ответ на действие внешних стрессоров повышение уровня АФК в клетке, необходимое для регуляции процессов развития.

1. Крицкий М.С., Белозерская Т.А., Соколовский В.Ю., Филиппович С.Ю. *Мол. биол.* 2005, 34(1), 602
2. Iigusa H., Yoshida Y., Hasunuma K. *FEBS Lett.* 2005, 579 (18), 4012

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФОЛАТОВ В СВЯЗИ С АНАЛИЗОМ ЭВОЛЮЦИИ ДНК-ФОТОЛИАЗ И КРИПТОХРОМОВ

The study of photochemical properties of folates in relation to the analysis
of the evolution of DNA-photolyases and cryptochromes

Юлия ВЕЧТОМОВА, Евгений СВИРИДОВ, Андрей БУГЛАК, Таисия ТЕЛЕГИНА

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН,
Москва, 119071, Россия;
E-mail: vechtomova@inbi.ras.ru; TEL: +7-495-952-15-00

В ДНК-фотолиазах, ферментах фотореактивирующих ДНК, поврежденную коротковолновым ультрафиолетом, а также в криптохромах (белках – фоторегуляторах онтогенеза и циркадных ритмов организмов) 5,10-метенилтетрагидрофолат (5,10-метенил-ТГФК) функционирует в составе фотосенсора в качестве светособирающей антенны, передающей энергию возбуждения на основной хромофор – молекулу флавина (в фотолиазах это анионная форма ФАД-Н⁻), отвечающий за фотокаталитическую функцию. Второй «антенный» хромофор (5,10-метенил-ТГФК, 7,8-дидезметил-8-гидрокси-5-деазарибофлавин (8-ГДФ), ФАД или ФМН) не обязателен для работы фермента, не влияет на связывание с субстратом, но при недостаточной освещенности увеличивает скорость фотореактивации на один-два порядка величин.

В данном докладе рассматривается комплекс свойств молекулы 5,10-метенил-ТГФК, которые могли сыграть роль в эволюционном отборе этого важнейшего кофермента «темновой» биохимии на роль хромофора в фотобелке. 5,10-метенил-ТГФК, как и другие «вторые хромофоры», имеет более высокий коэффициент экстинкции и более широкую полосу поглощения в области УФ-света ($\epsilon_{370\text{нм}} = 30000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для 5,10-метенил-ТГФК или $\epsilon_{440\text{нм}} = 40000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для 8-ГДФ) по сравнению с флавиновым хромофором ($\epsilon_{380\text{нм}} = 4000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Поскольку успешной работе «антенного» хромофора должна способствовать химическая стабильность молекулы при воздействии на неё света, представляет интерес устойчивость 5,10-метенил-ТГФК к действию УФ – излучения. В водном растворе в присутствии кислорода скорость фотолиза 5,10-метенил-ТГФК была на порядки величин ниже, чем у родственных соединений ($\Phi < 0,001$, для сравнения Φ фоторазрушения тетрагидрофолата равен 0,075, а 5-формилтетрагидрофолата – 0,027). При этом, в отличие от других фолатных коферментов, присутствие O_2 оказывало протекторное воздействие на молекулу. Есть основание полагать, что устойчивость 5,10-метенил-ТГФК к окислению и фотолизу обусловлено наличием в структуре молекулы положительно заряженного имидазольного кольца, которое в растворе существует только в кислых условиях. Высокая устойчивость к УФ-А излучению в присутствии кислорода в сочетании с высоким коэффициентом поглощения, а также универсальной доступностью кофермента в клетках, могли служить положительными селективными признаками при эволюционном отборе 5,10-метенил-ТГФК на роль светособирающей антенны в ДНК-фотолиазах и криптохромах.

Работа поддержана Программой Президиума РАН № 25 и грантом РФФИ № 11-04-01007-а.

ВЛИЯНИЕ ДОФА-МЕЛАНИНА НА ФОТОТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА А2Е The influence of DOPA-melanin on A2E phototoxic properties

Александр ДОНЦОВ, Анна КОРОМЫСЛОВА, Наталия САКИНА

ГУ «Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН», Москва,
119334, Россия;
E-mail: adontsovnick@yahoo.com; Fax: +7-495-137-41-01

Известно, что хромофор липофусциновых гранул глаза человека А2Е способен оказывать повреждающее действие на клетки ретинального пигментного эпителия [1]. Повреждающее действие А2Е связано как с фотоиндуцированными свободно радикальными реакциями, так и с токсичностью гидрофильных продуктов фотоокисления А2Е, которые могут мигрировать внутри клетки, проникая в различные клеточные органеллы [2]. Показано, что меланин способен ингибировать процесс фотоокисления А2Е и защищать клетки пигментного эпителия от повреждающего действия синего света [3]. Этот защитный эффект меланина может быть связан, по крайней мере, с тремя различными механизмами: экранирующим действием меланина; ингибированием фотоиндуцированных свободно радикальных процессов, сенсibilизированных А2Е; и связыванием А2Е меланином в неактивные комплексы.

Цель работы – исследование способности ДОФА-меланина (аналога природного меланина) связывать хромофор А2Е в комплексы и определение фототоксичности этих комплексов. В результате было показано, что ДОФА-меланин действительно образует комплексы с А2Е. Было выделено три комплекса ДОФА-А2Е с различной концентрацией А2Е внутри комплекса (максимальная концентрация А2Е в комплексе достигала 200 нмоль/мг меланина). Получены абсорбционные и флуоресцентные спектральные характеристики этих комплексов в сравнении с А2Е и ДОФА-меланином и исследовано влияние ультрафиолетового облучения на спектральные характеристики комплексов. Методом тушения хемилюминесценции люминола в присутствии пероксида водорода были определены антиоксидантные активности ДОФА-меланина и его комплексов с А2Е. Показано, что константы зависимости латентного периода хемилюминесценции от концентрации практически одинаковы для ДОФА-меланина и для его комплексов с А2Е. Сравнение ингибирующего действия ДОФА-меланина и комплексов ДОФА-А2Е на скорость УФ-индуцированной пероксидации кардиолипидов липосом и наружных сегментов фоторецепторных клеток показало более высокую ингибирующую активность комплексов по сравнению с чистым ДОФА-меланином. Результаты свидетельствуют, что хромофор липофусциновых гранул А2Е в изученных концентрациях, не только не уменьшает антиоксидантные свойства ДОФА-меланина, но даже, в определенной степени, усиливает их. Это дает основание предполагать, что избыток А2Е, который может мигрировать в цитоплазму из внутриклеточных органелл клетки пигментного эпителия РПЭ, по-видимому, будет связываться меланином меланосом и не сможет проявлять токсическое действие.

1. Shaban H., Richter C., *Biol. Chem.*, 2002, 383, 537;

2. Dontsov A., Sakina N., Golubkov A., Ostrovsky M., *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2009, 425, 98.

3. Wang Z., Dillon J., Gaillard E.R., *Photochem. Photobiol.*, 2006, 82, 474.

**НАСТРОЙКА СПЕКТРАЛЬНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ГЛАЗ
MYSIS RELICTA (CRUSTACEA) К СВЕТОВОЙ СРЕДЕ ОБИТАНИЯ**
Spectral tuning of *Mysis relicta* (Crustacea) eyes to different light environments

Павел **ЗАК**¹, Юлия **ДЕМЧУК**¹, Михаил **ОСТРОВСКИЙ**^{1,2}, Лариса **ПОГОДИНА**²,
Magnus **LINDSTRÖM**³, Kristian **DONNER**⁴

¹ИБХФ РАН, Москва, 119994, Россия;

E-mail: pavelzak@mail.ru; Fax: +8-499-137-41-01;

²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия,

³Tvärminne Zoological Station, University of Helsinki, F1-10900, Hanko, Finland.

⁴Biocenter of Helsinki University, F1-00014, Helsinki, Finland

Креветки *Mysis relicta* являются эволюционно молодым видом животных. 9 000 тыс. лет назад, на момент таяния ледниковых щитов они широко расселились в водоемах северного полярного круга с самыми разными условиями светового окружения. В частности, *M. relicta* обитают, как в красно-коричневой световой среде глубоководных озер Финляндии (доминирующая длина волны 680 нм), так и в зеленой световой среде Финского залива (доминирующая длина волны 575 нм) [1]. При этом глаза озерных креветок являются красночувствительными, а спектральная чувствительность морских креветок располагается в зеленой области [1, 2, 3]. Эти спектральные настройки к световой среде обитания связаны, в первую очередь, с разными спектральными формами их зрительных пигментов. Так, спектры поглощения зрительных клеток креветок озерной популяции имеют максимумы около 555 нм [3], которые по нашим последним данным сформированы смесью двух зрительных пигментов: P530 и P560 [5]. Максимум спектров поглощения морских креветок, как правило, располагается около 530 нм, однако встречаются особи с максимум спектров поглощения около 540 нм [5]. Наиболее вероятной причиной быстрой адаптивности глаз этих креветок к разным световым условиям могут быть известные для других животных обратимые замены хромофоров – витаминов A1 и A2, в одной и той же молекуле белка описана. Помимо, спектральных настроек, основанных на разнице в зрительных пигментах, глаза *M.relicta* содержат незрительные пигменты-омохромы, которые за счет ослабления синего света дополнительно сдвигают спектральную чувствительность этих креветок в длинноволновую сторону, в соответствии с требованиями окружающей световой среды [4].

1. Lindström M., Nilsson H.L., *J.Exp.Marine.Biol.Ecol.*, 1988, 120, 23.

2. Lindström M., *J Exp Marine Biol.*, 2000, 246, 85.

3. Jokela-Määttä M., Pahlberg J., Lindström M., Zak P.P., Megan P., Ostrovsky M., Cronin T., Donner K., *J.Comp. Physiol.A*, 2005, 191, 1087.

4. Абу Хамидх А.Е., Демчук Ю.В., Зак П.П., Линдстром М., Островский М.А., Вестник Московского Университета. Биология, 2010., №2, 51.

5. Демчук Ю.В., Зак П.П., Линдстром М., Доннер К., Островский М.А... Сб. трудов конф. XXV Любичевские чтения «Современные проблемы эволюции», Ульяновск, 2011, 122.

**ВЛИЯНИЕ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ
ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ПЛЕНКИ НА УРОЖАЙНОСТЬ *CUCUMIS SATIVUS***
Influence of luminescent radiation of fluorescent film
on the productivity of *Cucumis sativus*

Алексей **ИВАНИЦКИЙ**¹, Александр **МИНИЧ**¹, Ирина **МИНИЧ**¹,
Наталья **ПЕРМЯКОВА**¹, Максим **КОЛЧЕВ**¹, Георгий **ИВЛЕВ**²

¹Томский государственный педагогический университет, Томск, 634061, Россия;
E-mail: aleiv@tspu.edu.ru; Fax: +7-382-25-217-93;

²Институт оптики атмосферы СО РАН, Томск, 634050, Россия; E-mail: ivlev@iao.ru;
Fax: +7-382-24-920-86

В настоящее время в защищенном грунте используют флуоресцентные пленки, применение которых способствует ускоренному росту, развитию и повышению продуктивности растений [1–3]. Такие пленки за счет поглощения части УФ радиации введенными в их состав люминофорами флуоресцируют в узком интервале длин волн видимой области спектра [4]. По мнению большинства авторов именно флуоресцентное излучение таких пленок оказывает влияние на изменение жизнедеятельности растений под ними [1,4]. Нами в защищенном грунте исследовано влияние люминесцентного излучения флуоресцентной пленки с максимумом 619 нм при выращивании *Cucumis sativus* L. сорта Примадонна в регионе Томска. Интенсивность солнечной радиации в УФ и ФАР диапазонах измерялась на станции высотного зондирования Института оптики атмосферы СО РАН. Расчет вклада люминесцентного излучения флуоресцентных пленок в прошедшее через пленки солнечное излучение был проведен на основании данных интенсивности УФ излучения солнца с учетом коэффициентов трансформации излучения люминофоров в пленках по методике [5].

Под флуоресцентной пленкой (опыт) отметили повышение урожайности огурца на 20 % по сравнению с растениями, выращенными под немодифицированной пленкой (контроль). Увеличение урожайности *Cucumis sativus* происходило за счет более интенсивного развития репродуктивных органов под флуоресцентной пленкой. До начала сбора урожая в опыте отметили в 1,3 раза больше завязей, чем в контроле. Динамика урожайности огурца под флуоресцентной пленкой сопряжена с изменениями интенсивности люминесцентного излучения флуоресцентной пленки, которая в свою очередь определяется интенсивностью УФ излучения солнечной радиации и фотохимической стабильностью люминофора в пленке. Пики увеличения численности плодов огурца наблюдали на 2–4 сутки после максимальной экспозиции люминесцентного излучения флуоресцентных пленок.

1. Kusnetsov S.I., Leplianin G.V., Mironov U.I. et. al., *Plasticulture*, 1989, 3 (83), 13.
2. Минич А.С., Минич И.Б., Зеленьчукова Н.С. и др., *Сельскохозяйственная биология*, 2010, 1, 81.
3. Еспр Е., Salmeryn А., Fontecha А. et al., *Journal of Plastic Film and Sheeting*, 2006, 22, 85.
4. Карасев В.Е., *Вестник Дальневосточного отделения РАН*, 2002, 3, 51.
5. Райда В.С., Иваницкий А.Е., Бушков А.В. и др., *Оптика атмосферы и океана*, 2004, 2-3, 245.

**О ВОЗМОЖНОСТИ ФОТОВОЛЬТАИЧЕСКОГО ПОДХОДА
К ПРОБЛЕМЕ ЗРЕНИЯ**
About possibility of photovoltaic approach to the problem of vision

Геннадий КОМИССАРОВ¹, Илья НАГОВИЦЫН^{2,1}

¹Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, ул. Косыгина, д. 4, Москва, 119991, Россия, E-mail: komiss@chph.ras.ru, gkomiss@yandex.ru; Phone: +7-495-939-73-50;

²Центр естественно-научных исследований Института общей физики им. А.М. Прохорова РАН, ул. Вавилова, д. 38, Москва, 119991, Россия

В работе [1] рассмотрена возможность зрительной рецепции на основе фотовольтаического эффекта, в котором существенную роль играет перекись водорода (ПВ). В связи с этим проведены исследования фотовольтаических и оптических свойств ленточных пленок белков, содержащих хромофорные группы, в присутствии ПВ. Пленки получали на субфазе, содержащей 0,05 М КСl; переносили на SnO₂-оптически прозрачные электроды методом Ленгмюра-Шефера. Для пленок смеси бактериородопсина (БР) и фосфатидилхолина (ФХ) исследовано влияние ПВ, добавленной в электролит фотовольтаической ячейки. В случае монослойных пленок БР-ФХ наблюдали увеличение фотопотенциала (ФП) на 12–37 % при увеличении концентрации ПВ от 10⁻⁶ до 10⁻² М. Для трехслойных пленок БР-ФХ наблюдали падение ФП вдвое с ростом концентрации ПВ в электролите от 10⁻⁵ до 10⁻² М. π-А изотермы пленок БР-ФХ существенно не отличаются при изменении концентрации ПВ от 5×10⁻⁵ до 5×10⁻² М в наносимом на субфазу растворе. В противоположность этому, в случае модельных комплексов бычьего сывороточного альбумина и мезотетрафенилпорфирина (БСА-ТФП) при добавлении ПВ во всех случаях наблюдали падение молекулярной площади. Так, при поверхностном давлении 15 мН/м молекулярная площадь БСА-ТФП составляет 9505, 8556, 7914, 7806 Å² для растворов с концентрацией ПВ 0, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ М соответственно. Такое уменьшение молекулярной площади может быть связано с изменением структуры белка. Исследовано изменение флуоресценции комплексов БСА-ТФП (λ_{ex} = 420 нм, λ_{em} = 658 нм) в растворе в течении 20 минут после добавления ПВ (10⁻⁶–10⁻² М). Полученные зависимости во всех случаях немонотонны и отличаются для различных концентраций ПВ. Максимальные наблюдаемые изменения интенсивности флуоресценции для раствора БСА-ТФП без добавления ПВ и при добавлении ПВ 10⁻⁶ М близки и составляют около 25%. При увеличении концентрации ПВ явно выражено снижение интенсивности флуоресценции, величина которого составляет 34–46%. Можно предположить, что существенную роль в механизме зрительной рецепции играет генерация фото-ЭДС в содержащих фотоактивные соединения мембранах, причем концентрация эндогенной ПВ модулирует величину фото-ЭДС. Полученный материал на данном этапе исследований не позволяет пока выйти за рамки предположений, но, как мы полагаем, он может быть полезен в будущем в поиске подходов к протезированию зрительного аппарата. Работа поддержана проектом МНТЦ № 3910.

1. Комиссаров Г. Г. «Фотосинтез: физико-химический подход», М.: УРСС, 2003, 224 с.

ОСОБЕННОСТИ ФИТОХРОМНОЙ РЕГУЛЯЦИИ РОСТА РАСТЕНИЙ ГОРОХА РАЗНЫХ ГЕНОТИПОВ ПОД УФ-А СВЕТОМ

Peculiarities of phytochrome regulation of plant growth of different *Pisum sativum* L.
genotypes under UV-A light

**КОППЕЛЬ Л.А., КОЧЕТОВА Г.В., БЕЛЯЕВА О.Б., GURUPRASAD K.¹,
WELLER J.², СИНЕЦКОВ В.А.**

Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова; 119991 Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12; тел: (495)9395489

E-mail: koppel@mail.ru, vsineshchekov@yahoo.com

¹ School of Life Sciences, Devi Ahilya Univ., Indore, India, 04-270; Tel: (91731)2467029

² School of Plant Science, University of Tasmania, GPO Box 252-55, Hobart, Tasmania 7001, Australia, Tel.: +61 3 6226 7828

Роль УФ света в фотофизиологии растений привлекает внимание в связи с обогащением солнечного света УФ компонентом из-за нарушения озонового слоя атмосферы. Обнаружены, в частности, позитивные эффекты исключения этого компонента на рост и развитие растений (Guruprasad et al., 2007). В данной работе предпринято изучение возможного участия фитохрома (phy) в этих эффектах. Исследовали влияние УФ-А, поглощаемого фитохромом, а также УФ-В на состояние пигмента и его функциональные проявления в этиолированных растениях гороха *Pisum sativum* L., содержащих phyA и phyB.

Четырехдневные проростки [линии Зеленый ранний (ЗР), Torsdag и фитохром-дефицитные мутанты на его основе] освещали УФ светом в течение 1 часа; вторую группу растений – дополнительно 5 минут насыщающим дальним красным светом (ДКС, 720 нм). Действие света оценивали через 24 часа инкубации проростков в темноте по характеру роста осевых органов и состоянию phyA (методом спектрофлуорометрии *in vivo*). Контролем служили растения, выращенные в темноте в течение 5 дней. Использовали УФ-А свет высокой ($\lambda_{\max} = 365$ нм, $70 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ – УФ-А) и низкой интенсивности ($\lambda_{\max} = 375$ нм, $6 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, УФ-а) и УФ-В свет ($\lambda_{\max} = 315$ нм, $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$). У растений Torsdag дикого типа (*wt*) после УФ-А наблюдали типичную реакцию подавления роста побегов и корней на 25%, тогда как после УФ-а снижался только рост корня. У ЗР, напротив, УФ-а приводил к сильному росту побегов, но не корня; эффект частично обращался ДКС. Под действием УФ-А или УФ-В прирост побегов ЗР был менее выражен. Для мутантов Torsdag под УФ-а обнаружено следующее: у бесфитохромного (*phyAphyB*) подавление роста только корня; у *phyA* подавление роста и побега и корня на 20–25% (аналогично *wt* под УФ-А); у *phyB*, напротив, прирост побега и корня. В эпикотильях гороха общее содержание phyA после предосвещения УФ-а и УФ-А незначительно понижалось, однако при этом наблюдали перераспределение его нативных пулов (Sineshchekov, 2010) – рост доли минорного и стабильного phyA' за счет основного и лабильного phyA. При этом у Torsdag *wt* пул phyA' возрастал в большей степени (на 48%), в меньшей степени у ЗР (на 40%) и мутанта *phyB* (на 13%). Проведенный анализ позволяет заключить, что ростовые реакции на УФ-свет опосредованы фитохромом, их направленность и выраженность зависят от интенсивности освещения, от генотипа и органа растения – в побеге и корне они происходят независимо друг от друга. Действие phyA и phyB в ответ на УФ-а разнонаправленно – phyA в форме phyA' стимулирует рост побега и корня, а phyB подавляет, при этом проявление эффекта phyA' зависит от его светостабильности.

Исследования поддержаны грантом РФФИ № 11-04-01732а.

ПРОБЛЕМЫ ЭВОЛЮЦИИ ФЛАВОПРОТЕИНОВЫХ ФОТОРЕЦЕПТОРОВ

М.С.КРИЦКИЙ

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

Открытие в последние десятилетия нескольких семейств флавопротеиновых фоторецепторов, обслуживающих регуляторные и информационные процессы у представителей самых различных таксономических групп, сместило традиционное физиологическое изучение, так называемых, «ответов организмов на синий свет» в область анализа молекулярной структуры и функций конкретных белков и их хромофоров. Функционирование этих рецепторов света - криптохромов, LOV-домен- и BLUF-домен-содержащих белков, а также структурно родственных криптохромам фотоферментов ДНК-фотолиаз, оказалось связано с реакциями фотоиндуцированного переноса электрона, в которых задействованы возбужденные молекулы FMN и FAD, а также (в случае ДНК-фотолиаз и криптохромов) с процессами резонансного переноса энергии с участием антенных хромофоров, в том числе, 5,10-метенил-тетрагидрофолата, либо 8-гидрокси-7,8-дидеметил-5-деазарибофлавина, т.е. соединений, известных, как и флавины, своими коферментными функциями в «темновом» биокатализе.

Помимо исследования структуры все возрастающего количества флавопротеиновых фоторецепторов и углубления представлений о функционировании их фотоциклов, самостоятельную задачу составляет анализ эволюционных аспектов флавиновой фотобиохимии. В рамках этой проблематики существует несколько задач, ряд из которых возникает при анализе эволюции и других групп белков-фоторецепторов, а некоторые специфичны именно для флавопротеиновых рецепторов света.

(1) Насколько универсальна флавиновая фотобиохимия как биологическое явление и насколько глубоки ее эволюционные корни?

(2) Моно- или полифилетично происхождение фоторецепторных флавопротеинов?

(3) Почему в роли светочувствительных хромофоров в белках оказались не специализированные молекулы, а универсальные коферменты «темнового» метаболизма? На каких принципах базировался отбор этих молекул?

(4) Можно ли проследить параллелизм в эволюции флавопротеинового фотокатализа и световых процессов фотосинтеза?

(5) Каковы особенности стыковки фотохимического механизма и систем трансдукции фотосигнала?

В докладе будет сделана попытка дать экспериментально обоснованные ответы на поставленные выше вопросы.

Поддержано Программой фундаментальных исследований № 25 Президиума РАН и грантом РФФИ 11-04-01007-а.

ИНДУЦИРОВАННЫЕ СВЕТОМ ПРЕВРАЩЕНИЯ ТЕТРАГИДРОБИОПТЕРИНА В СВЯЗИ С ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИМИ ФУНКЦИЯМИ

The light-induced transformations of tetrahydrobiopterin in connection with the photobiological functions

Тамара ЛЮДНИКОВА, Таисия ТЕЛЕГИНА, Андрей БУГЛАК

Учреждение Российской академии наук Институт Биохимии им. А.Н. Баха, РАН,
Москва, 119071, Россия;

E-mail: lyudnikova@inbi.ras.ru, TEL: +7-495-952-34-31

Биологические птерины рассматриваются как возможные хромофоры фоторецепторных белков (в качестве кофакторов ряда ферментов), а также в качестве мишеней регуляторного воздействия UV-A и UV-B на метаболизм. Являясь коферментом гидроксилаз ароматических аминокислот и NO-синтаз, тетрагидробиптерин (H_4Bpt) становится участником окислительно-восстановительных превращений, приводящих к образованию продуктов одно- и двухэлектронного окисления этого кофермента. Целью данной работы было исследование влияния света на ряд редокс превращений H_4Bpt в условиях разной концентрации O_2 в растворе. Идентификация продуктов реакции основывалась на ВЭЖХ-разделении с параллельным использованием фотометрической, флуоресцентной и электрохимической детекции. Совместное использование нескольких детекторов расширило аналитические возможности метода, позволяя, например, идентифицировать среди продуктов окисления (по флуоресценции) дигидроптерин (H_2Pt), время выхода которого с колонки совпадает со временем выхода нефлуоресцирующего H_4Bpt .

Фотовозбуждение птеридинового гетероцикла H_4Bpt ультрафиолетом (λ 290–390 нм) в присутствии O_2 приводило к образованию более окисленных форм H_4Bpt (его дигидроформы и биоптерина), а также появлению тетрагидроптерина (H_4Pt), дигидроптерина (H_2Pt) и дигидроксантоптерина (H_2XPt). Состав продуктов окисления H_4Bpt зависел от состава буферного раствора: при окислении H_4Bpt в трис буфере pH 7,1 в интервале от 30 до 60 мин. накапливался H_2Pt , тогда как в фосфатном буфере pH 7,3 преобладающим продуктом окисления был H_2Bpt .

В условиях микроаэрации ($[O_2] = 0,6$ об.%), которая достигалась контролируемой продувкой кюветы аргоном, УФ-облучение приводило к снижению уровня H_4Bpt на 31% (в темноте 5%). При полной аэрации ($[O_2] = 20,9$ об.%) фотовозбуждение молекулы H_4Bpt вызывало значительное увеличение скорости ее окисления: $k_{H_4Bpt} = 0,735$ (в темноте $k_{H_4Bpt} = 0,038$).

При облучении в течение 30 минут уровень H_2Pt снижался. Одновременно происходило образование и накопление соединения, идентифицированного нами, предположительно, как 6-ОН-тетрагидроптерин, спонтанно переходящего при хранении в дигидроксантоптерин.

Полученные результаты обсуждаются в плане возможности участия различных неконъюгированных птеринов в явлениях фоторецепции, а также фоторегуляторных процессах, в том числе, имеющих отношение к медицине.

Работа поддержана грантом РФФИ 11-04-01007-а.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ОСВЕЩЕНИЯ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ КОРНЕЙ У ИЗОЛИРОВАННЫХ СЕМЯДОЛЕЙ СОРТОВ ОГУРЦА

Effect of light conditions on roots regeneration
in culture of isolated cotyledons of cucumber

ОМАРОВА З.А., ГАДИСОВА З.И.

Дагестанский государственный университет, кафедра физиологии растений

На увлажнённой водой фильтровальной бумаге в ч. Петри изолированные семядоли (ИС) растений арбузов, дынь, кабачков, огурцов и тыкв, отделённые от проростков разного возраста, проявляли высокую активность фото- и, особенно, скотоморфогенеза (рост, регенерация корней) (Омарова, Магомедова, 2002, 2007; Омарова, Самедова, 2008 и др.). Однако, у ИС огурцов, изолированных от 5-10 сут проростков, регенерацию корней в темноте наблюдали только после предкультивирования на естественном дне в теч 3-х сут. Известно, что свет стимулирует генеративный морфогенез каллусов, улучшая условия углеводного питания и осуществляя регуляторные реакции. Предполагалось, что субстратная функция света в регуляции генеративного морфогенеза стерильной культуры может быть заменена достаточно высокой концентрацией сахара в среде (Константинова и др., 1975). Для конкретизации факторов, способствующих регенерации корней ИС огурцов, отделённые от 6-8 сут проростков сортов Конкурент (К) и Феникс (Ф), культивировали *in vitro* в стерильных условиях на среде по Мурашиге-Скуга (МС) (А), чистом агаре – 6 г/л (Б), среде МС без микросолей (В); без макросолей (Г); без витаминов (Д); без сахарозы (Е); на агаре (6 г/л) с добавлением 30 г/л сахарозы (Ж). Режимы освещения: I – естественный день; II – непрерывная темнота; III – смена режимов I → II и II → I через каждые 7 сут. Пролиферации каллуса на раневой поверхности ИС в реж. I способствовало культивирование в вар. А (у 41–44 % ИС) и, особенно, В (83%), а в реж. II только в вар. В (33%). Морфогенез корней на раневой поверхности в реж. II превышал по срокам и активности показатели реж. I в вар. А, В, Г, Д. Так, у с. К в реж. II укоренилось 100% ИС, а в реж. I – 64%. ИС в реж. III коррелируют с ИС в реж. II по средним срокам регенерации корней, а по количеству укоренившихся ИС – с реж. I. В вар. Б в реж. I у обоих сортов 12–35% ИС регенерировали тонкие короткие корни, а в реж. II у с. Ф укоренилась за всё время только 1 ИС. По состоянию процессов морфогенеза ИС самые низкие показатели отмечали в вар. Е: низкий прирост, быстрая деградация хлорофилла, даже в реж. I, полное отсутствие (0%) каллусо- и ризогенеза и стремительная некротизация на 16–17 сут. В тоже время, в вар. Ж, у с. К при культивировании в реж. I и II регенерировали корни 42 и 69% ИС соответственно, а у с. Ф – 23 и 53%. Таким образом, для фото- и, особенно, скотоморфогенеза ИС наиболее значимым фактором явилось наличие или отсутствие сахарозы в среде МС. А внесение сахарозы в чистый агар в значительной мере компенсировало отсутствие других компонентов среды МС и освещения (реж. II). Известно, что сахароза наряду с ауксинами участвует в формировании проводящих пучков, в основном, ксилемы, многократно усиливая физиологический эффект ауксинов. Значение света и сахарозы в пролиферации корней у ИС нуждается в дальнейшем изучении.

**БАКТЕРИОРОДОПСИНЫ *EXIGUOBACTERIUM*: КАК ОНИ РАБОТАЮТ
И ДЛЯ ЧЕГО НУЖНЫ МИКРООРГАНИЗМАМ ИЗ ВЕЧНОЙ МЕРЗЛОТЫ**
**Bacteriorhodopsins of *Exiguobacterium*: how do they work and what is their function
in permafrost microorganisms**

**Л. Е. ПЕТРОВСКАЯ¹, Е. П. ЛУКАШЕВ², С. П. БАЛАШОВ³, Е. А. КРЮКОВА¹,
С. В. СЫЧЕВ¹, В.Н. НОВОСЕЛЕЦКИЙ², Е.В. СПИРИНА¹,
Д.А. ГИЛИЧИНСКИЙ⁴, Д.А. ДОЛГИХ¹, А. Б. РУБИН², М. П. КИРПИЧНИКОВ²**

¹ Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997, Россия
E-mail: lpetr65@yahoo.com, Fax : (495)3306983

² Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия

³ University of California, Irvine, USA

⁴ Учреждение Российской академии наук Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, Пущино, Россия

В течение последнего десятилетия продемонстрировано существование значительного количества ретиналь-содержащих мембранных белков – структурных аналогов бактериородопсина (БР) *Halobacterium salinarum* – у протеобактерий, актиномицетов, цианобактерий, грибов и других микроорганизмов. В частности, ген потенциального БР обнаружен в геноме Грам-положительной бактерии *Exiguobacterium sibiricum*, выделенной из образца вечномерзлого грунта. С целью изучения свойств этого белка нами сконструирована система экспрессии гена ESR в клетках *E. coli* и разработана методика его выделения из мембранной фракции клеток.

Рекомбинантный ESR связывает ретиналь и демонстрирует типичный для бактериородопсина спектр поглощения с максимумом 534 нм. Исследование фотоиндуцированных изменений поглощения в ответ на одиночный лазерный импульс (532 нм, ~10 нс) показало, что образование промежуточного состояния M у ESR происходит в 100 раз быстрее, чем у BR (0,5 мкс вместо 50 мкс), а выход и стабильность O-продукта существенно выше. В результате измерения фотоиндуцированного изменения pH в суспензии ESR-содержащих липосом установлено, что при поглощении света ESR осуществляет выброс протонов в среду, обеспечивая ее закисление. Таким образом, полученный нами белок является новым представителем семейства транспортных бактериородопсинов, выполняющих функцию протонных насосов.

При помощи ПЦП с ESR-специфическими праймерами обнаружены еще два гена потенциальных бактериородопсинов, гомологичных ESR, у *Exiguobacterium* sp. AT1b и *Exiguobacterium* 7-3w. Сравнение аминокислотных последовательностей ESR и БР, а также гомологичных ретиналь-связывающих белков позволяет высказать предположение об участии в транспорте протона ряда аминокислотных остатков, являющихся аналогами D96, D85, R82 и других. Обсуждаются возможные функции ESR у бактерий рода *Exiguobacterium* в природных условиях.

Работа проводится при финансовой поддержке программы РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 - 2013 г.

ФОТОРЕГУЛЯЦИЯ РОСТА ПЕРВИЧНОГО КОРНЯ *ARABIDOPSIS* Photoregulation of the *Arabidopsis* primary root growth

Ирина СТРИЖ

Биологический факультет Московского государственного университета
им. М.В.Ломоносова, Ленинские горы д.1, кор.12, г. Москва, 119991, Россия
E-mail: irina.strizh@mail.ru; Факс.: (495) 939-43-09.

Важнейшим внешним фактором, регулирующим рост и развитие корня, является свет. Было установлено, что гравитропизм и элонгация корней регулируются, в частности, красным светом и фитохромами [1]. Рецепторы синего света – криптохромы и фототропины, также участвуют в регуляции роста корня растяжением и его фототропизма [2]. Предполагают, что фоторегуляция роста растяжением может осуществляться посредством изменения гормонального баланса растущих клеток корня и, по-видимому, напрямую через регуляцию белков-переносчиков ауксина. Известно, что перераспределение ауксин-выносящего переносчика PIN1 в ходе фототропизма, индуцированного синим светом, регулируется фототропином, кодируемым геном *phot1* у *Arabidopsis* [3]. Другие рецепторы синего света – криптохромы, положительно влияют на рост растяжением корня и это влияние, как полагают, осуществляется также путем взаимодействия криптохромной сигнальной системы и сигнальных путей ауксинов [2]. В настоящий момент достоверно доказано, что активные формы кислорода (АФК) не просто участвуют, а являются необходимыми факторами роста и развития корня. Принципиально важным моментом является тот факт, что АФК являются необходимыми участниками каталитического цикла пероксидаз, участвующих в метаболизме ауксинов [4]. Можно предположить, что гормональный контроль фотозависимого роста и развития корня может осуществляться, в частности, посредством пероксидаз и АФК. Мы выявили, что показанное ранее зональное распределение АФК в корнях проростков, выращиваемых в условиях освещения, не обнаруживается ни флуоресцентным и гистохимическим методами в кончике корня 6-дневных этиолированных проростков *Arabidopsis*, однако развивается в процессе деэтиоляции. Освещение этиолированных проростков узкополосным светом с помощью светодиодов выявило, что ни красный (660 нм), ни дальний красный (730 нм) свет не инициируют развитие АФК-зависимого окрашивания, тогда как действие синего света (420 нм) было сопоставимо с действием белого света. Показано, что рецепция светового сигнала, изменяющего уровень АФК, происходит как в побегах, так и в корне. Анализ по базе данных TAIR результатов ДНК-микрорррей и собственных результатов электрофореза, позволяет предположить, что синий свет индуцирует в корнях экспрессию пероксидаз PER64, PER69 и PER71, участвующих в продукции АФК, необходимых для инициации роста корня. Вероятными фоторецепторами синего света, индуцирующего экспрессию пероксидаз, являются криптохромы. Доказательство этого предположения является предметом дальнейших исследований.

1. Correll M.J. and Kiss J.Z., *Plant Cell Physiol.* 2005, 46, 317

2. Canamero R.C., Bakrim N., Bouly J.-P., Garay A., Dudkin E.E., Habricot Y., Ahmad M., *Planta*, 2006, 224, 995

3. Sullivan J.A., Deng X.W. *Developmental Biology*, 2003, 260, 289

4. Газарян И.Г., Хушпудьян Д.М., Тишков В.И., Успехи биологической химии, 2006, 46, 303

ФЛАВИНЫ И ПТЕРИДИНЫ КАК СЕНСИБИЛИЗАТОРЫ ФОТОФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В ЭВОЛЮЦИОННО-ПРИМИТИВНОЙ СИСТЕМЕ

Flavins and pteridins as sensitizers of photophosphorylation in evolutionary primitive system

Таисия ТЕЛЕГИНА, Михаил КОЛЕСНИКОВ, Юлия ВЕЧТОМОВА

Учреждение Российской академии наук Институт Биохимии им. А.Н. Баха, РАН,
Москва, 119071, Россия;
E-mail: telegina@inbi.ras.ru; TEL: +7-495-952-25-47

Открытие в последние годы нескольких семейств фоторецепторных белков, в которых роль хромофоров – сенсоров фотона играют производные птеридина (флавины, фолат), акцентировало интерес к роли этих молекул в эволюционно древних фотобиохимических процессах. В работе рассматривается экспериментальная модель фотофосфорилирования, использующая в качестве рецепторов света пигменты, абиогенно образующиеся при термоконденсации доступных аминокислот (глутаминовой кислоты, глицина и лизина) и абиогенно конъюгированные с термокондансатами аминокислот - протеиноидами. При замене в исходном материале глицина на аланин, среди образующихся термоконденсатов преобладали не флавины, а птеридины. Эти данные подтверждены трехмерными спектрами флуоресценции термоконденсатов.

Флавин- и птеридин-содержащие конъюгаты сенсibilизировали процесс фотофосфорилирования АДФ ортофосфатом с образованием АТФ в комплексе с минеральной силикатной матрицей. В качестве таковой использовали коллоидные наночастицы оксида кремния, образующиеся при полимеризации мономерной формы ортокремниевой кислоты $\text{Si}(\text{OH})_4$ и имеющие диаметр не более 200 нм. Процесс фосфорилирования протекал как под действием УФА, так и видимого света (в области поглощения пигментов – флавина и птеридина) с выходом АТФ до 19–20% (в расчёте на моль исходной АДФ). Спектры действия фотофосфорилирования соответствовали спектрам поглощения флавинов и птеридинов. В качестве источника света использовали ртутную лампу среднего давления (λ_{max} 365 нм) со светофильтром, пропускающим излучение от 290 до 380 нм. Донором электрона служила Na_2 -ЭДТА, а регенерировать пигмент в рабочее состояние мог O_2 , H_2O_2 , либо «бескислородный» акцептор, например (в эксперименте) Fe^{3+} – цитохром с. В контрольных пробах, где использовали наночастицы оксида кремния без пигментов, либо растворы пигментов без наночастиц оксида кремния, образование АТФ практически не наблюдалось.

Можно полагать, что птеридины и флавины, занявшие в последующей эволюции место хромофоров в ряде семейств фотоферментов (ДНК-фотолиаз) и фоторецепторов регуляторных процессов (криптохромов, BLUF- и LOV-домен содержащих белков), могли быть участниками древнейших фотобиологических систем. Обращает на себя внимание, что условием эффективного протекания процессов с участием их возбужденных молекул было участие орго-минеральных матриц.

Работа поддержана Программой Президиума РАН № 25 и грантом РФФИ 11-04-01007-а.

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В ТРАНСДУКЦИИ ФОТОСИГНАЛА
У *NEUROSPORA CRASSA*

The role of nitric oxide in transduction of photosignal in *Neurospora crassa*

Светлана ФИЛИППОВИЧ¹, Галина БАЧУРИНА¹, Михаил ОНУФРИЕВ²,
Данил ПЕРЕГУД³

¹Институт биохимии им.А.Н.Баха РАН, Москва, 119071, Россия;
E.mail: syf@inbi.ras.ru; Fax: 8-495-954-27-32;

²Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва,
117485, Россия;

³Национальный научный центр наркологии Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, Москва, 119002, Россия

Аскомицет *Neurospora crassa* интенсивно используется как модель для изучения различных светозависимых процессов – циркадных ритмов, фотоадаптации и фотоморфогенеза. Исследовали 3 различных типа фоторегулируемых процессов развития этого мицелиального гриба – фотоиндукцию каротиногенеза и фотостимуляцию образования вегетативных спор и предшественников женских половых структур – протоперитециев.

Роль оксида азота в фотоморфогенезе дикого штамма *wt-987* и мутантов *nit-2* (нет нитритредуктазы NiR и нитратредуктазы NR) и *nit-6* (нет NiR) *N. crassa* оценивали по поведению конечных продуктов распада NO, нитратов и нитритов, внутри мицелия и в среде культивирования и по поведению фермента его синтеза – NO-синтазы. Показано, что при изучении фотоответов гриба необходимо учитывать, что мутации, связанные с нарушением синтеза NiR и NR, приводят к изменению рецепции светового сигнала при фотокаротиногенезе и фотоконидиогенезе в зависимости от природы источника азота в среде культивирования. Анализ динамики выхода ионов нитрита из мицелия в ходе фотоиндуцированного каротиногенеза и фотостимулируемого конидиогенеза *nit-6* штамма *N. crassa* свидетельствует о возможном участии NO-генерирующего механизма в трансдукции фотосигнала. Результаты по введению в среду культивирования донора оксида азота, S-нитрозоглутатиона, ингибитора NO-синтазы, L-нитроаргинина, и нитрита натрия являются косвенным свидетельством участия NO в фотоконидиогенезе. Вместе с тем, отсутствие выброса NO₂ в среду в ходе светорегулируемого развития половых структур *N. crassa*, указывает на малую вероятность участия оксида азота в этом процессе. Радиометрическим методом в клетках дикого типа (но не *nit*-мутантов) *N. crassa* обнаружена NO-синтазная активность, которая по ряду свойств (чувствительность к Ca, действие специфических ингибиторов фермента, вестерн-блот анализ) сходна с индуцибельной формой фермента из животных. Светозависимые изменения удельной активности NO-синтазы в фотокаротиногенезе и фотоконидиогенезе гриба не выявлены, поэтому можно предположить, что в данных фотопроцессах *N. crassa* реализуется другой NO-генерирующий механизм.

Работа поддержана грантом РФФИ 11-04-01007-а.

**УЧАСТИЕ ФОТОРЕЦЕПТОРА ДРОЖЖЕЙ ФИТОХРОМНОГО ТИПА
В ИНДУЦИРОВАННОМ СВЕТОМ ПОВЫШЕНИИ УСТОЙЧИВОСТИ
КЛЕТОК К УФ В-ИЗЛУЧЕНИЮ**

**Involvement of yeast phytochrome-type photoreceptor
in light-induced increasing the cell resistance to UV-B-radiation**

Григорий ФРАЙКИН

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва
119991, Россия; E-mail: GFraikin@yandex.ru

Фитохромы составляют широко распространенное семейство чувствительных к красному (К)/ дальнему красному (ДК) свету фоторецепторов, впервые обнаруженных у высших растений, где они выполняют функцию ключевых регуляторов фотоморфогенеза. Первые указания на функциональную роль фитохромов у гетеротрофных организмов можно отнести к 70-м годам прошлого века, когда у дрожжей *Candida guilliermondii* были выявлены К – ДК – фотообратимые эффекты, опосредованные фоторецептором, сходным по своим спектроскопическим характеристикам с растительным фитохромом [1]. В последнее время гипотеза о более широком распространении фитохромных фоторецепторов подтверждена открытием бактериальных фитохромов; найдены фитохромы и у некоторых видов грибов, однако об их функциях, как и бактериофитохромов, известно пока очень мало. В настоящем сообщении анализируются новые данные о закономерностях фотоиндуцированных эффектов защиты и реактивации УФ-облученных дрожжей *C. guilliermondii* в связи с участием в их инициации фитохромоподобного фоторецептора. Спектры действия фотозащиты (ФЗ) и фотореактивации (ФР) в области 400–750 нм обнаруживают главный максимум при 680 нм и проявляют близкое сходство с абсорбционными спектрами растительных и бактериальных фитохромов. Другие общие для обоих фотопроцессов особенности состоят в том, что они индуцируются кратковременным (2–5 мин) воздействием на клетки низкоинтенсивного монохроматического света в малых дозах и характеризуются специфической (с выраженным оптимумом) зависимостью от времени освещения, которая определяется соотношением активной и неактивной форм фоторецептора на свету (в темноте время существования активной формы составляет 30–40 мин). Постулируется, что в основе ФР-680 и ФЗ-680 лежит общий активируемый светом репарационно-защитный механизм, триггеруемый одним фоторецептором; проявление инициируемых им процессов в виде эффектов ФР либо ФЗ зависит от последовательности воздействий на клетки видимого света и УФВ-излучения. Процессы ФР-680 / ФЗ -680 принципиально отличаются от известных механизмов ферментативной ФР и ФЗ, спектральная чувствительность которых ограничена синим и/или ближним УФ-светом. Механизм ФР-680/ФЗ -680 не связан с фотоиндуцированным изменением активности конститутивных систем репарации УФ поврежденных ДНК – эксцизионной и пострепликативной. В соответствии с концепцией, которую мы сейчас развиваем, участие дрожжевого фоторецептора в защитно-репарационных процессах связано с его влиянием на активность индуцибельной репарационной системы посредством регуляции экспрессии определенных генов.

1.Fraikin G., Pospelov M., Rubin L. J. Gen. Microbiol. 1976, 95, №1, 27.

Секция 4

БИОМЕДИЦИНСКИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ ФОТОФИЗИКИ И ФОТОХИМИИ

ПРИМЕНЕНИЕ ОСТ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЕКТОРНОЙ ДОСТАВКИ МАГНИТНЫХ МИКРОКОНТЕЙНЕРОВ С ФОТОДИНАМИЧЕСКИМИ ИЛИ ФОТОТЕРМИЧЕСКИМИ КРАСИТЕЛЯМИ

Гариф АКЧУРИН^{1,2}, Георгий АКЧУРИН², Дмитрий ГОРИН^{1,3},
Татьяна КОЛЕСНИКОВА³, Владимир МАКСИМОВ⁴, Сергей ПОРТНОВ³,
Глеб СУХОРУКОВ⁶, Геннадий ХОМУТОВ⁵, Борис ХЛЕБЦОВ⁷, Николай ХЛЕБЦОВ^{4,7}

¹СГУ им.Н.Г.Чернышевского, Саратов, 410012, Россия;

E-mail: AkchurinGG@mail.ru; Fax:(8452)27-85-29;

²Институт точной механики и управления РАН, Саратов, 410028, Россия;

³Объединенный исследовательский центр технологий и измерения наноструктур СГУ;

⁴Областная офтальмологическая больница, Саратов, 410051, Россия;

⁵МГУ им. М.В.Ломоносова, физический факультет, Москва, 119992, Россия;

⁶IRS at Biomaterials, Queen Mary University of London, E1 4NS, London, UK;

⁷Институт биохимии и физиологии растений РАН, Саратов, 410049, Россия

Предложен способ векторной доставки магнитных микрокапсул с фотодинамическими или фототермическими красителями и контроль процесса накопления с помощью ОСТ, относящийся области биомедицинских технологий, в частности к созданию технологии селективного лазерного разрушения раковых клеток [1]. Методом последовательной адсорбции полиэлектролитов и наночастиц магнетита сформированы наноконформные микрокапсулы диаметром 5 мкм. Фотосенсибилизатор капсулируют в полимерные микроконтейнеры, оболочка которых содержит наночастицы магнетита (Fe_3O_4) и вводят в окружающую опухоль биоткань. В объеме опухоли создают внешнее постоянное магнитное поле, пространственная конфигурация которого совпадает с формой опухоли. Лазерное облучение производят через время соответствующее максимальному накоплению микроконтейнеров в опухоли при плотности энергии излучения достаточной для фотодинамического или фототермического разрушения оболочек микроконтейнеров внутри опухоли и последующего фотодинамического или фототермического разрушения клеток раковой опухоли. Размеры и форма полимерных микроконтейнеров, оболочка которых содержит наночастицы магнетита (Fe_3O_4) контролировалась с помощью электронной микроскопии.

Методом низко-когерентной оптической томографии (ОСТ 3000 фирмы Carl Zeiss) исследована динамика пространственного перемещения наноконформных микроконтейнеров, содержащих в оболочке наночастицы магнетита, в жидкой среде различной вязкости, образованной смесью глицерина и воды в разных пропорциях. Показана возможность управляемого транспорта данных микрокапсул под действием магнитного поля и установлена зависимость скорости микроконтейнеров от вязкости среды. Полученные микроконтейнеры охарактеризованы методами атомно-силовой и просвечивающей электронной микроскопии.

Исследован процесс разрушения микроконтейнера, содержащего в оболочке магнитные и золотые частицы при облучении лазером с длиной волны, совпадающей с плазменным резонансом золотых наночастиц.

1. Акчурин Г. Г., Акчурин Г. Е.мл., Горин Д. А., Колесникова Т. А., Портнов С. А., Скиртач А. Г., Сухоруков Г. Б., Хлебцов Б. Н., Хлебцов Н. Г. Патент РФ № 2 405 600. Опубл. 10.12.2010. Бюл. №34

УФ-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ И ЛОКАЛИЗАЦИИ CD3, CD4 И CD8 МАРКЕРОВ Т-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

UV-induced changes in expression level and localization of CD3, CD4 and CD8 markers of T-lymphocytes of human blood

АРТЮХОВ В.Г., ВДОВИНА В.А., ПУТИНЦЕВА О.В.

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж, 394006, Россия;
E-mail: avg@main.vsu.ru; Fax: 8(473)2208308

АУФОК-терапия в последнее время широко применяется в клинической практике для коррекции нарушений в работе иммунной системы больных. Однако механизмы иммуностимулирующего действия данного метода, связанные с состоянием клеточных маркеров, требуют дальнейшего изучения. В связи с этим мы исследовали влияние УФ-света (240–390 нм) в дозах 151–1359 Дж/м² на уровень экспрессии и локализацию молекул антигенраспознающего рецепторного комплекса (CD3, CD4, CD8 маркеров) на поверхности мембран Т-лимфоцитов крови человека.

Лимфоциты выделяли из периферической крови доноров методом седиментации в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho=1,077$ г/см³). Облучение суспензий клеток проводили в термостатируемой (37°C) стеклянной кювете сверху светом ртутно-кварцевой лампы ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 (240–390 нм) в дозах 151, 453, 906 и 1359 Дж/м². Уровень экспрессии изучаемых маркеров на поверхности мембран нативных и фотомодифицированных Т-лимфоцитов после суточной инкубации определяли методом проточной цитофлуориметрии. Изучение локализации CD3, CD4, CD8 рецепторов на поверхности нативных и фотомодифицированных Т-клеток исследовали методом непрямой иммунофлуоресценции.

Было установлено, что средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) CD3⁺ клеток после действия на смесь лимфоцитов УФ-света в дозах 151–906 Дж/м² повышалась на 12 %, 11 % и 15 %, а в дозе 1359 Дж/м² – снижалась на 10% относительно нативных образцов. УФ-свет во всех используемых дозах индуцировал увеличение СИФ CD4⁺Т-лимфоцитов на 20–30%, а CD8⁺-клеток – на 16–34% соответственно.

Выявлено, что УФ-свет в дозе 151 Дж/м² не вызывал увеличения числа кэспирующих иммуноцитов, зато приводил к появлению клеток с амебовидным типом свечения (CD3⁺, CD8⁺) и флуоресцирующих по типу «кэп 1/4» (CD4⁺). После действия УФ-света в дозах 453, 906 и 1359 Дж/м² доля кэспирующих CD3⁺- и CD4⁺-клеток достоверно повышалась, также появлялись клетки с амебовидным типом свечения (CD3⁺) и флуоресцирующие по типу «кэп 1/4» (CD4⁺). Увеличение числа кэспирующих CD8⁺-клеток наблюдалось после облучения лимфоцитов УФ-светом в дозах 453 и 906 Дж/м².

Таким образом, УФ-свет (240–390 нм) в дозах 151–1359 Дж/м² индуцирует изменение поверхностного фенотипа Т-лимфоцитов, вызывая повышение или понижение уровня экспрессии молекул антигенраспознающего рецепторного комплекса (CD3, CD4 и CD8 маркеров) и перераспределение их на поверхности иммунокомпетентных клеток в виде «кэспинг»-эффекта с образованием рецепторных кластеров различных типов («кэп 1/2», «кэп 1/4» и амебовидный кэп).

Выявленные нами УФ-индуцированные модификации поверхностного фенотипа иммунокомпетентных клеток могут отразиться на функциональной активности Т-лимфоцитов, что необходимо учитывать при проведении АУФОК-терапии.

**ВЛИЯНИЕ ЖЕЛАТИНА НА ХАРАКТЕРИСТИКИ БИФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ
СВЕТЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ NADH:FMN-ОКСИДОРЕДУКТАЗА-ЛЮЦИФЕРАЗА**
**Influence of gelatin on characteristics of coupled enzyme system of luminous bacteria
NADH:FMN-oxidoreductase-luciferase**

Анна БЕЗРУКИХ¹, Елена ЕСИМБЕКОВА^{2,1}, Валентина КРАТАСЮК^{1,2}

¹Сибирский федеральный университет, пр. Свободный 79, Красноярск, 660041, Россия;

E-mail: aebezrukih@gmail.com; Tel.: +7-391-244-08-41; Fax: +7-391-244-87-90;

²Институт биофизики СО РАН, Академгородок, Красноярск, 660036, Россия

Биферментная система светящихся бактерий NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза используется для разработки специфических методов анализа различных метаболитов и активности ферментов, а также является тест-объектом для определения интегральной токсичности различных сред. Кроме того, бактериальная биолюминесцентная система благодаря удобству регистрации ферментативной активности может стать основой для экспериментального моделирования функционирования ферментов внутри клетки путём подбора соответствующего вязкого микроокружения. При этом существует проблема быстрой инактивации биферментной системы при воздействии неблагоприятных факторов (температуры, pH). Одним из основных способов получения стабильных и удобных в использовании ферментных препаратов является иммобилизация ферментов в различных средах. Целью данной работы было изучить характеристики ферментов светящихся бактерий, помещённых в вязкое микроокружение желатина, а также получить иммобилизованный реагент путём включения биферментной системы в желатиновый гель.

В ходе работы была исследована активность биферментной системы, включающей в себя люциферазу из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* (*P. leiognathi*) и NADH:FMN-оксидоредуктазу из *Vibrio fischeri*, в присутствии желатина разных концентраций (0,5%, 1%, 1,5%, 5%) в диапазоне температур от 10 до 50°C. Была изучена термоинактивация биферментной системы, при этом ферменты инкубировали в течение 0,5–30 минут при разных температурах в интервале от 10 до 50°C в 0,5%, 1% и 5% растворах желатина. Было показано, что активность биферментной системы и кинетика её термоинактивации в желатине, не образующем гель, (золе) и в гелеобразном желатине различаются. В то время как помещение ферментов в золь желатина приводит к снижению интенсивности биолюминесценции, включение ферментов в гелевую матрицу желатина способствует их стабилизации и увеличению выхода активности. Было выявлено, что термоинактивация биферментной системы имеет нелинейный характер и протекает по диссоциативному механизму. Также показано, что желатин в виде золя ускоряет первый этап термоинактивации, а гелеобразный желатин, напротив, способствует активации биферментной системы.

Также на основе ферментов светящихся бактерий был получен иммобилизованный реагент путём включения ферментов в желатиновый гель с последующей процедурой высушивания. Данный реагент обладает хорошей стабильностью в процессе хранения: в течение 2 месяцев ферментативная активность иммобилизованного реагента не изменяется. При этом интенсивность свечения иммобилизованного реагента сопоставима с интенсивностью свечения эквивалентного количества растворимой биферментной системы.

**ПАРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В СИСТЕМЕ
ХЛОРИН Е6 – ПЛЮРОНИК – АЛЬБУМИН – ЛИПОСОМА**
Interactions in the system chlorin e6 – pluronic F127 – albumin – lipid membrane

**БОЛТАЕВ Умед¹, ЖИЕНТАЕВ Тимур¹, СОЛОВЬЕВА Анна²,
МЕЛИК-НУБАРОВ Николай¹**

¹Химический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия
E-mail: bolum@mail.ru

²Институт Химической Физики им. Н.Н. Семенова Российской Академии Наук

Фотодинамическая терапия в настоящее время является одним из перспективных методов лечения раковых заболеваний. Исследования в нашей лаборатории показали, что некоторые водорастворимые полимеры (поли-N-винилпирролидон, плуроники, полиэтиленоксид, поливиниловый спирт), усиливают фотодинамическую активность хлорина е6. Перед нами стояла задача определить причину влияния полимеров на фотоактивность.

В ходе исследований стало ясно, что на фотоактивность хлорина е6 могут влиять сывороточные белки (сывороточный альбумин и липопротеиды). Для изучения влияния данных белков на эффект, оказываемый полимерами, мы провели опыт, в котором измеряли фотокаталитическую активность хлорина е6 в присутствии и в отсутствие полимера и сыворотки. Выяснилось, что наибольшую фототоксичность хлорин е6 проявляет в отсутствие сыворотки и плуроника, при добавлении плуроника, активность уменьшается, еще меньше активность в присутствии плуроника и сыворотки, а наименьшая активность хлорина е6 проявляется в сыворотке без полимера.

Результаты исследования взаимодействия хлорина е6 с белками сыворотки и полимерными мицеллами методом эксклюзионной хроматографии указывали на то, что полимер влияет на взаимодействие хлорина е6 с сывороточными компонентами. Для количественной характеристики системы «хлорин е6 – белки сыворотки – липидная мембрана – мицеллы полимера» мы измерили эффективные константы равновесия, характеризующие парные взаимодействия.

С учетом концентраций в клеточных опытах хлорин е6 оказывается связанным в основном с альбумином и липопротеидами, и согласно полученным результатам, полимер не должен влиять на концентрацию хлорина е6 в клетке. По всей видимости, эффективность композиции хлорина е6 с плуроником для фотодинамической терапии определяется не столько сдвигом равновесия, а сколько влиянием на кинетику перехода хлорина е6 в клетки. Действительно, если хлорин е6 вначале смешать с сывороткой, а затем добавить в систему плуроник, увеличения фотокаталитической активности не наблюдается. Этот факт хорошо согласуется с тем, что сродство хлорина е6 к альбумину и липопротеиду значительно выше его сродства к мицеллам плуроника. Однако в том случае, если хлорин е6 вначале поместить в мицеллы, их переход на альбумин оказывается медленнее, чем переход на липопротеиды, и в этой ситуации хлорин е6 с большей эффективностью накапливается в клетках.

ФОТОПРОЦЕССЫ В СЕНСИБИЛИЗАТОРАХ КУМАРИНА
Photoprocesses in coumarin sensitizers

Наталья БРЯНЦЕВА¹, Ирина СОКОЛОВА¹, Руслан ГАДИРОВ¹
Владимир ХИЛЯ², Яна ГАРАЗД²

¹Томский государственный университет, Томск, Томская область, 634050, Россия
E-mail: brjantseva@gambler.ru; Tel./Fax: (3822)53-30-34

²Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, Киев, 01033, Украина

Фуурокумарины (псоралены) нашли применение в ПУФА-терапии {Псорален + ультрафиолетовое излучение (УФ) А-диапазона (320–400 нм)} [1]. В качестве источников возбуждения для медицинского применения кумаринов часто используют излучение ламп. Применение этих соединений требует знания их фотофизических свойств, они и будут определять дальнейший ход фотохимических и фотобиологических процессов, так как все они протекают с участием электронно-возбужденных состояний, преимущественно триплетных. Только при установлении фундаментальных закономерностей таких свойств со строением веществ можно планировать целенаправленный синтез новых, перспективных для применения веществ.

Целью работы являлось экспериментальное и теоретическое установление связи спектрально-люминесцентных, фотофизических свойств со структурой гидразо- и фуурокумаринов для применения их в качестве сенсibilизаторов.

По результатам проведенного исследования некоторых характеристик (см. таблицу) можно сделать вывод, что соединение КС4 обладает необходимыми фотосенсибилизирующими свойствами, и рекомендуется для предклинических испытаний в медицинских учреждениях для ПУФА-терапии в качестве $\pi\pi^*$ -сенсibilизатора.

Таблица. Свойства исследованных соединений с точки зрения потенциального применения в качестве сенсibilизатора

Соединение	КС1	КС2	КС3	КС4	КС5
Характеристика	Подходит ли свойство				
Флуоресценция	да	да	да	да	да
Фосфоресценция	нет	нет	да	да	да
Время жизни фосфоресценции	нет	нет	да	да	да
Стабильность в этаноле	да	да	да	да	да
Стабильность в воде	нет	нет	нет	да	нет
Растворимость в воде	нет	нет	нет	да	да
Токсичность	–	–	–	да	да

1. Morison W.L. // *Photodermatol., Photoimmunol., Photomed.* – 2004. – V. 20. – № 6. – 315-320

**ФОТОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ТЕТРАГИДРОБИОПТЕРИНА В КОНТЕКСТЕ
МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ВИТИЛИГО И ПОДХОДОВ
К ФОТОТЕРАПИИ ЭТОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ**
**Photochemical reactions of tetrahydrobiopterin
in the context of metabolic disorders in vitiligo**

**Андрей БУГЛАК, Тамара ЛЮДНИКОВА, Таисия ТЕЛЕГИНА, Юлия ВЕЧТОМОВА,
Михаил КРИЦКИЙ**

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,
Москва 119071, Россия;
E-mail: andreybuglak@gmail.com; TEL: +7(495)952-25-47

Птериновые коферменты служат обязательными участниками ряда важнейших метаболических процессов. Среди функций тетрагидробиоптерина (H_4 Bpt) – участие в качестве кофактора в ферментативном гидроксировании ароматических аминокислот (фенилаланина и тирозина). Поскольку биоптерин, в том числе, его восстановленные коферментные формы, поглощают ультрафиолет, в том числе, УФА фотоны, и их возбужденные молекулы могут вступать в ряд химических реакций, возник интерес к возможному использованию УФ-радиации для коррекции ряда метаболических нарушений, связанных с ферментативными реакциями, в которых участвуют эти коферменты или их производные.

Витилиго – это изменения пигментации кожи, связанные с нарушением меланиногенеза и исчезновением меланина. Предполагается, что патология связана с нарушением цикла регенерации H_4 Bpt вследствие инактивации птерин-4а-карбиноламиндегидратазы перекисью водорода, возникающей при окислительном стрессе, в том числе, инициированном птеринами. Недостаточное количество H_4 Bpt в клетке может снижать интенсивность меланиногенеза. В связи с этим возникает необходимость детальной проработки фотохимических процессов с участием птеринов (особенно H_4 Bpt) в связи с этиологией и перспективами терапии витилиго.

Мы исследовали фотохимические реакции окисления H_4 Bpt и его более окисленных форм в растворе. Показано что окисление молекулы идет как по птериновому циклу с образованием дигидробиоптерина (H_2 Bpt), так и с отрывом боковой цепи (1,2-дигидроксипропила) и образованием дигидроптерина (H_2 Pt). В первом случае дальнейшее окисление приводит к появлению биоптерина, а во втором – птерина и ксантоптерина. Под действием света скорость реакции окисления значительно возрастает (при действии УФ константа скорости повышается в 4 раза), а набор продуктов реакции становится более разнообразным.

Заключительным этапом цикла регенерации H_4 Bpt является реакция восстановления хиноноидной формы дигидробиоптерина. Нами показано, что под воздействием ультрафиолета в присутствии доноров электрона в растворе происходит неэнзиматическое восстановление дигидроформ птеринов. Мы предполагаем, что с неэнзиматическими процессами регенерации H_4 Bpt связан недавно предложенный метод фототерапии витилиго с использованием УФ-ламп с излучением $\lambda = 311$ nm.

Работа поддержана грантом РФФИ 11-04-010007a.

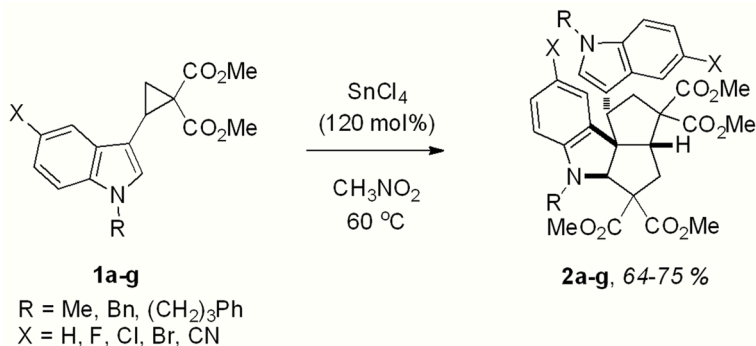
**ЦИКЛОДИМЕРИЗАЦИЯ ИНДОЛПРОИЗВОДНЫХ
ДОНОРНО-АКЦЕПТОРНЫХ ЦИКЛОПРОПАНОВ:
ОДНОСТАДИЙНЫЙ СИНТЕЗ ПЕНТАЛЕНО[1,6a-b]ИНДОЛОВ**
Cyclodimerization of indole derivatives of donor-acceptor cyclopropanes:
single-stage synthesis of pentalene [1,6a-b]indoles

Екатерина **БУДЫНИНА**, Ольга **ИВАНОВА**, Игорь **ТРУШКОВ**, Михаил **МЕЛЬНИКОВ**

Химический факультет, Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова 119991 Москва, Ленинские горы 1-3
E-mail: ekatbud@kinet.chem.msu.ru
URL: <http://www.chem.msu.su/rus/lab/chemkin/chemkin-people/Budynina.html>

Интерес к соединениям ряда индола связан, в основном, с широким спектром проявляемой ими физиологической активности, такой как противораковая, противовирусная, антибактериальная, гормоностимулирующая и другие виды активности.

Недавно в нашей группе была найдена реакция циклодимеризации индолпроизводных донорно-акцепторных циклопропанов **1**, которая приводит к соединениям **2**, содержащим индольный и индолиновый фрагменты в одной молекуле. В процессе этой реакции происходит формирование двух новых циклов, трех С-С связей и четырех стереоцентров с исключительной хемо-, регио- и стереоселективностью. На основе реакции был разработан метод синтеза и получена серия пенталено[1,6a-b]индолов **2a-g**.



Для ряда соединений **2** было изучено их влияние на жизнеспособность культуры раковых клеток человека HeLa. Несмотря на низкую растворимость, все изученные соединения проявили среднюю цитотоксичность, что является основанием для дальнейших исследований данных образцов. С помощью флуоресцентных методов представляется перспективным изучение пути попадания соединений типа **2** в клетку, их локализации и метаболизма.

**ДИНАМИКА ДВУХФОТОННЫХ ДВУХЦВЕТНЫХ ПЕРЕХОДОВ
В ХРОМОФОРАХ, ВОЗБУЖДАЕМЫХ ФЕМТОСЕКУНДНЫМИ ЛАЗЕРНЫМИ
ИМПУЛЬСАМИ**

**Dynamics of two-color two-photon excited transitions in chromophores excited by
femtosecond laser pulses**

**О. С. ВАСЮТИНСКИЙ¹, А. Г. СМОЛИН¹, П. С. ШТЕРНИН¹,
S. DENICKE², К.-Н. GERICKE²**

¹Физико-технический институт им. А.Ф.Иоффе РАН, Санкт Петербург, 194121, Россия
e-mail: osv@pms.ioffe.ru, FAX: +7-812-297-10-17

²TU Braunschweig, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Braunschweig,
38106, Germany

В докладе представлены результаты теоретических и экспериментальных исследований поляризованной флуоресценции в молекулах хромофоров, возбуждаемой посредством двухфотонных переходов, инициированных фемтосекундными импульсами лазера. На основе техники сферических тензоров, получены общие квантово-механические выражения, описывающие интенсивность флуоресценции в условиях изотропной вращательной диффузии и справедливые для произвольных молекул типа симметричного или асимметричного волчка и для любых поляризаций всех трех фотонов, участвующих в фотопроцессе. Эти выражения записаны в терминах зависящих от времени молекулярных параметров $M_k(R, Rg, t)$ которые содержат всю информацию о динамике фотопроцесса и могут быть непосредственно определены из эксперимента.

Экспериментальные исследования проводились на молекулах р-терфенил (РТР) в растворе циклогексан/парафин. Флуоресценция возбуждалась при одновременном поглощении молекулой РТР двух лазерных импульсов с длиной волн 400 нм и 800 нм, что соответствовало суммарной энергии возбуждения 4,649 эв. Используя различные комбинации поляризаций всех трех фотонов, участвующих в фотопроцессе, мы определили семь молекулярных параметров, описывающих динамику фотопроцесса. Анализ полученных результатов был проведен на основе неэмпирических расчетов структуры возбужденных состояний молекулы РТР и матричных элементов вертикальных переходов. В результате анализа было показано, что в условиях проведенного эксперимента молекулярная флуоресценция была в основном обусловлена d_z компонентой дипольного момента молекулы, направленного вдоль ее длинной оси симметрии. Определены все компоненты тензора двухфотонного возбуждения и показано, что этот тензор симметричный. Установлено, что двухфотонное поглощение в молекулах РТР осуществляется одновременно по двум независимым каналам. Один из этих каналов сопровождается заселением полностью симметричного возбужденного состояния молекул, в второй – неполносимметричного состояния. В обоих случаях двухфотонные оптические переходы запрещены в дипольном приближении и становятся возможными только благодаря наличию интенсивного электрон-колебательного взаимодействия в молекулах РТР.

1. P. S. Shternin, K.-H. Gericke, O. S. Vasyutinskii, *Molecular Physics*, 2010, 108(7), 813.

2. S. Denicke, K.-H. Gericke, A. G. Smolin, P. S. Shternin, O. S. Vasyutinskii, *J. Phys. Chem. A* 2010, 114, 9681.

**ЛИЗИС ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК,
ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫЙ АКТИНОМИЦИНОМ**
Lysis of cancer cells, photo-induced by actinomycin

ВЕКШИН Н.Л.

Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская область
nvekshin@rambler.ru тел. (4967) 73-94-32

Актиномицин Д (АМД) заметно усиливает фотодеструкцию опухолевых клеток (в культуре или суспензии). К примеру, без антибиотика при облучении светом (450-вт ксеноновая лампа с тепловым фильтром – раствором сернокислой меди) разрушалось около 20% клеток *HeLa*, а при проникновении АМД внутрь – около 60%. На фотографии (рис.1-а) показаны клетки *HeLa*, прокрасившиеся АМД. При облучении светом часть клеток полностью разрушается, а часть сильно повреждается (рис. 1-б). При фоторазрушении клеток *HeLa* оставшийся недеструктурированным пул антибиотика выходит в раствор, и оптическая плотность повышается (рис. 2). Это однозначно говорит о том, что светопоглощательная способность антибиотика внутри клеток существенно ниже, чем в растворе. Коротковолновый сдвиг максимума поглощения у АМД (после фотодеструкции и выхода оставшегося пула антибиотика в воду) составляет около 5 нм. По-видимому, спектр АМД, регистрируемый после его фотодеструкции в *HeLa*, обусловлен в основном не свободными молекулами антибиотика, а молекулами, связанными с ДНК и белками (т.к. АМД гидрофобен).

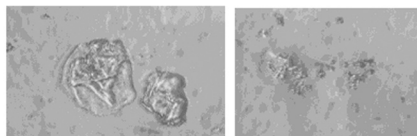


Рис. 1-а и 1-б. Микрофотографии (микроскоп Carl Zeiss и фотокамера Sony Cyber Shot) клеток *HeLa*, прокрасившихся АМД, до и после светового облучения.

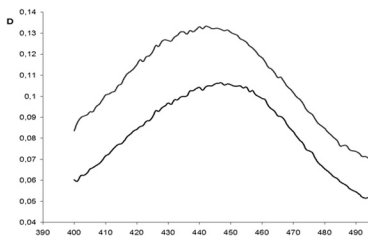


Рис. 2. Выход АМД в раствор при фотодеструкции клеток *HeLa*. Фотодеструкция проводилась с помощью 450-вт ксеноновой лампы через жидкостный тепловой фильтр (5% раствор сульфата меди). Образцы при облучении и последующем спектрофотометрировании находились в стандартных 1-см кварцевых кюветках.

1. Векшин Н.Л. Флуоресцентная спектроскопия биополимеров. Пущино, Фотон-век, 2008, 168 с.
2. Векшин Н.Л. Биофизика ДНК-актиномициновых нано-комплексов. Пущино, Фотон-век, 2009, 192 с.

Ca²⁺-РЕГУЛИРУЕМЫЕ ФОТОПРОТЕИНЫ В БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Ca²⁺-regulated photoproteins in biomedical research

Евгений **ВЫСОЦКИЙ**, Светлана **МАРКОВА**, Наталья **МАЛИКОВА**,
Артем **ЕРЕМЕЕВ**, Людмила **БУРАКОВА**

Институт биофизики СО РАН, Красноярск, 660036, Россия;
E-mail: eugene_vysotski@ibp.ru; Fax: +7-391-243-3400

Среди многообразия биoluminesцентных систем особое место занимают системы, получившие название «предварительно заряженных». Наиболее известными представителями таких систем являются Ca²⁺-регулируемые фотопротеины, ответственные за свечение морских кишечнорастных [1]. Фотопроtein представляет собой стабильный фермент-субстратный комплекс, состоящий из односубъединичного полипептида и «преактивированного» кислородом субстрата, 2-гидропероксицелентеразина, прочно, но нековалентно связанного с белком. Биoluminesценция инициируется добавлением Ca²⁺ и возникает как следствие декарбоксилирования 2-гидропероксицелентеразина. В результате образуются молекула целентерамида в возбужденном состоянии и CO₂. Переход целентерамида из возбужденного состояния в основное сопровождается излучением кванта света ($\lambda_{\max} = 465\text{--}495$ нм) [2].

Одно из основных применений фотопротеинов обусловлено самой природой реакции – способностью генерировать свет в ответ на появление Ca²⁺. Благодаря этому свойству и нетоксичности для клеток фотопротеины успешно используются для измерения внутриклеточного кальция более 40 лет. Клонирование кДНК генов, кодирующих фотопротеины, открыло новые возможности их применения: апофотопроtein экспрессируется в клетке, целентеразин добавляется снаружи, диффундирует в клетку, где из апобелка и целентеразина образуется активный фотопроtein. Такие клетки, фактически, имеют «встроенный» индикатор кальция. В настоящее время этот подход широко используется, т.к. позволяет избежать таких трудоемких процедур, как микроинъекция или загрузка фотопротеина в клетки с помощью липосом. Кроме того, фотопроtein может быть экспрессирован практически в любом компартменте клетки, что делает возможным мониторинг локальных изменений концентрации кальция.

Акворин и обелин, которые наиболее изучены среди Ca²⁺-регулируемых фотопротеинов, позволяют измерять [Ca²⁺] в диапазоне 0,3–100 мМ [3]. Хотя для большинства применений этот диапазон чувствительности вполне удовлетворяет, в некоторых случаях необходимо иметь фотопроtein или с более высокой, или более низкой чувствительностью, например, для измерения Ca²⁺ в митохондриях или ЭПР. В работе приведены результаты по конструированию мутантов обелина с измененными аффинностью к Ca²⁺ и спектрами излучения, которые, в перспективе, могут стать основой технологий синхронной регистрации изменений кальция в различных компартментах клетки.

1. Высоцкий Е.С., Маркова С.В., Франк Л.А. *Молекулярная биология*, 2006, 40 (3), 404

2. Vysotski E.S., Lee J. *Acc. Chem. Res.*, 2004, 37 (6), 405

3. Illarionov B.A., Frank L.A., Illarionova V.A., Bondar V.S., Vysotski E.S., Blinks J.R. *Methods Enzymol.*, 2000, 305, 223

АНАЛИЗ УФ-ИНДУЦИРОВАННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ И ИНТЕНСИВНОСТИ КЭПИНГА CD2 РЕЦЕПТОРОВ Т-ЛИМФОЦИТАМИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

The analysis of UV-induced changes in expression level and capping intensity of CD2 receptors by T- lymphocyte of human blood

Светлана ДУБОВА, Валерий АРТЮХОВ, Ольга ПУТИНЦЕВА

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж, 394006, Россия;
E-mail: dubowa.84@mail.ru; Tel.: +7-4732-20-85-86; Fax.:+7-4732-20-87-55

Выяснение молекулярных основ процессов, протекающих в цепи иммунологических реакций в клетках, является одной из актуальных проблем медицинской биофизики. При этом УФ-излучение используется в качестве тонкого и специфического инструмента для решения проблем выяснения строения и функционирования клеток и их систем. Среди молекул клеточной адгезии Т-лимфоцитов одним из ключевых звеньев в регуляции межклеточных взаимодействий являются CD2 рецепторы. Данные маркеры обеспечивают возможность реагирования Т-клеток на более низкие концентрации антигенов и, тем самым, опосредуют успешное протекание иммунного ответа организма.

В связи с вышеизложенным нами было исследовано влияние широкого диапазона доз УФ-света (151+1359 Дж/м²) на уровень экспрессии и интенсивность процессов кэппинга CD2 рецепторов Т-лимфоцитов крови человека.

Суспензии Т-лимфоцитов облучали светом ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 (светофильтр УФС-1). Дозы облучения клеточных суспензий – 151, 453, 906 и 1359 Дж/м². Оценку уровня экспрессии и локализации CD2 маркеров на поверхности мембран Т-лимфоцитов после 24 ч инкубации осуществляли с помощью методов проточной цитофлуориметрии и иммуноферментного анализа, и люминесцентной микроскопии соответственно.

Анализ полученных нами данных указывает на то, что под действием УФ-света в мембранах Т-лимфоцитов, в первую очередь, активируются процессы, способствующие снижению уровня экспрессии CD2 антигенов. В ходе суточной инкубации УФ-облученные (151–906 Дж/м²) лимфоциты, предположительно, путем запуска процессов синтеза *de novo* молекул адгезии нивелируют эффект УФ-света. Воздействие «большой» дозы УФ-излучения (1359 Дж/м²), вероятно, оказывает сильное ингибирующее действие на экспрессию CD2 молекул, что сопровождается падением их экспрессии и отсутствием синтеза *de novo*. Одновременно наблюдается усиление кэппинга исследуемых рецепторов. По-видимому, за счет протекания последнего достигается возможность концентрирования CD2 молекул на поверхности мембраны клетки в малом объеме, т.е. в «необходимом» количестве, обеспечивающем нормальное развитие иммунного ответа.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что индуцированные УФ-излучением изменения экспрессии и кэппинга CD2 рецепторов мембран Т-лимфоцитов являются тесно взаимосвязанными процессами.

**ИММОБИЛИЗОВАННЫЙ МНОГОКОМПОНЕНТНЫЙ РЕАГЕНТ
ДЛЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА**
Immobilized multi-component reagent for bioluminescent assay

Елена ЕСИМБЕКОВА^{1,2}, Валентина КРАТАСЮК^{2,1}

¹Институт биофизики СО РАН, Академгородок, Красноярск, 660036, Россия;
E-mail: esimbekova@yandex.ru; Тел.: +7-391-249-42-42, Факс: +7-391-243-34-00;

²Сибирский федеральный университет, пр. Свободный 79, Красноярск, 660041, Россия

Разработан многокомпонентный реагент «Энзимолум», основанный на совместно иммобилизованных в крахмальный гель биферментной системе светящихся бактерий НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза и ее субстратах (миристиновый альдегид и НАДН) [1]. Реагент «Энзимолум» представляет собой диск диаметром 6–7 мм, сухой вес $1,5 \pm 0,2$ мг. Реагент может быть использован в качестве тест-объекта для экологического и других видов мониторинга [2]. Реакцию тест-объекта определяют по изменению параметров биолюминесценции в присутствии токсических веществ по сравнению с контрольными значениями.

Разработаны способы увеличения чувствительности реагента к действию токсических веществ, подобраны условия проведения анализа, позволяющие определять содержание токсических веществ с максимальной эффективностью, соответствующей или ниже их уровня ПДК. Наибольшая чувствительность реагента к действию токсических веществ достигается при проведении предварительной инкубации реагента «Энзимолум» в анализируемом образце воды в течение 3–5 минут.

Проведено сравнение чувствительности растворимой и многокомпонентной иммобилизованной биферментной системы к действию рядов органических поллютантов (фенолов, хинонов и солей тяжелых металлов). Показано, что иммобилизованные ферменты наиболее чувствительны к действию фенолов и хинонов: 0,002 мг/л для пирокатехина, 0,02 мг/л для гидрохинона, от 0,01 мг/л для бензохинона до 0,05 мг/л для толухинона, что соответствует или ниже их уровня ПДК. Наименьшая чувствительность реагента отмечается к действию солей тяжелых металлов.

Реагент сохраняет высокую ферментативную активность в течение не менее одного года и стабилен по отношению к денатурирующим воздействиям: рН-оптимум биферментной системы при иммобилизации в крахмальный гель расширяется, как в кислую, так и щелочную области, повышается термостабильность ферментов, что позволяет использовать реагент как в лабораторных, так и полевых условиях без обеспечения специальных условий хранения. Реагент может служить биологической основой для разработки биолюминесцентного биосенсора для анализа токсичности различных сред.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (государственный контракт № 02.740.11.0766), Министерства образования и науки Российской Федерации и Американского фонда гражданских исследований и развития (гранты № 2.2.2.2/5309 и RUX0-002-KR-06/BR4M02), Российской Академии наук (Программа «Молекулярная и клеточная биология»), а также Президента РФ (грант НШ 64987.2010.4).

1. Патент РФ № 2413772. Биолюминесцентный биомодуль для анализа токсичности различных сред и способ его приготовления. Опубл. 10.03.2011.

2. Патент РФ № 2413771. Экспресс-способ биотестирования природных, сточных вод и водных растворов. Опубл. 10.03.2011.

ГОЛОГРАФИЧЕСКИЙ ФЕМТОСЕКУНДНЫЙ ЛАЗЕРНЫЙ МАНИПУЛЯТОР И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

Holographic femtosecond laser optical tweezers and its applications

Александр ЗАЛЕССКИЙ^{1,2}, Никита ДАНИЛЬЧЕНКО², Юрий БАРБАШОВ²,
Георгий МАКСИМОВ⁴, Игорь РЕШЕТОВ³, Олег САРКИСОВ⁴

¹ Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, г. Москва

² Московский Физико-Технический Институт(ГУ), г. Москва

³ ФГУ Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А.Герцена, г. Москва

⁴ Московский Государственный Университет, г. Москва
aleksandr.zalesskij@phystech.edu

Оптическое манипулирование – перспективный метод исследований, обладающий колоссальным спектром применений в таких областях, как физика, химия и биология. Данная работа посвящена созданию голографического лазерного манипулятора и «скальпеля» с применением фемтосекундного и непрерывного лазеров. Излучение непрерывного лазера используется для осуществления оптического захвата и манипулирования, а при помощи фемтосекундного лазерного излучения выполняется активное физико-химическое воздействие на объекты изучения (клетки, скопления клеток, биоплёнки, и пр.). Использование фемтосекундных импульсов для реализации оптического скальпеля даёт следующее важное преимущество: даже при сравнительно малых энергиях импульса (порядка 1 нДж) высокая пиковая интенсивность фемтосекундных импульсов позволяет с успехом использовать их как «наноскальпель» – осуществлять высоколокализованное воздействие, что открывает возможности для развития нанохирургии. В установке используется два оптических жидкокристаллических модулятора, позволяющих как для фемтосекундного, так и для непрерывного лазера вместо одной оптической ловушки создавать много оптических ловушек, каждая из которых может перемещаться в пространстве независимо от других.

Продемонстрирована возможность деструкции раковых клеток и отрезания фрагмента от скопления раковых клеток. Также продемонстрирована одновременная микрохирургия несколькими оптическими «скальпелями» единичных аксонов и ядерных эритроцитов. На базе разработанной установки разрабатывается технология терапевтического клонирования, целью которого является получение индивидуальных эмбриональных стволовых клеток.

**ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ И КЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ
КАТИОННОГО ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ХОЛОСЕНСА**
Peculiarities of molecular and cellular interactions of cationic photosensitizer Holosens

**Александра МАСЛОВА¹, Анастасия ИГНАТОВА², Владимир НЕГРИМОВСКИЙ³,
Евгений ЛУКЬЯНЕЦ³, Алексей ФЕОФАНОВ^{1,2}**

¹Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992, Россия;

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;
Email: aignatova_83@mail.ru, тел. (495) 336-17-66

³Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научный центр «НИОПИК», Москва, 123995, Россия.

Гидрофильный октакатионный фотосенсибилизатор (ФС) Холосенс представляет собой холиновое производное фталоцианина цинка. Показано, что Холосенс обладает высокой антибактериальной [1] и противоопухолевой [2] фотоиндуцированной активностью *in vitro* и *in vivo*, и таким образом, является перспективным ФС широкого спектра действия. Цель данной работы – детальное изучение особенностей взаимодействия Холосенса с раковыми клетками и биологическими молекулами.

Установлено, что Холосенс эффективно проникает в цитоплазму клеток нейробластомы человека Neuro-2a, распределяется в цитоплазме диффузно, а также усиленно накапливается в околядерной области. В ядра клеток Холосенс не проникает. Накопление Холосенса в клетках возрастает линейно в диапазоне внеклеточных концентраций 1-8 мкМ. Время полунакопления Холосенса в клетках Neuro-2a составляет 60 мин, а насыщение накопления достигается через 3 ч инкубации. Полувыведение Холосенса из клеток Neuro-2a происходит за 5 ч.

Холосенс характеризуется двумя внутриклеточными спектрами флуоресценции с максимумами ($\lambda_{\text{фл}}$) 680 и 701 нм, которые отличны от спектра препарата в воде ($\lambda_{\text{фл}} = 690$ нм), что указывает на образование, как минимум, двух типов внутриклеточных комплексов. Исследованы молекулярные взаимодействия Холосенса человеческим и бычьим сывороточными альбуминами, α -, β - и γ -глобулинами, РНК, модельными мембранными системами на основе Тритона-X100 и додецилсульфата натрия. Изучено влияние образования комплексов с биологическими молекулами на спектральные свойства Холосенса и его способность к генерации синглетного кислорода.

Установлено, что Холосенс проявляет высокую фотодинамическую активность в отношении клеток Neuro-2a, которая реализуется в субмикромольном диапазоне концентраций, указывая на возможность применения Холосенса для фотодинамической терапии нейробластомы.

1. Negrimovsky V., Mamikonyan V., Balayan M., Budzinskaya M., Fedorov F., Strakhovskaya M., Shevchik S., Loschenov V., Kuzmin S., Vorozhtsov G., *Book of abstracts 12th Congress of European society for photobiology*, Bath, England, 2007, P. 149.

2. Морозова Н.Б., Плютинская А.Д., Кармакова Т.А., Якубовская Р.И., Чиссов В.И., Феофанов А.В., Негримовский В.М., Южакова О.А., Лукьянец Е.А., Ворожцов Г.Н., *VII съезд онкологов России. Сборник материалов*, Москва, 2009, Т.1, С.71.

**СТАБИЛИЗАЦИЯ ЛЮЦИФЕРАЗЫ СВЕТЛЯКОВ *L. MINGRELICA* МЕТОДАМИ
НАПРАВЛЕННОГО И СЛУЧАЙНОГО МУТАГЕНЕЗА**
Stabilization of *L. mingrelica* firefly luciferase by site-directed and random mutagenesis

Михаил КОКШАРОВ, Наталья УГАРОВА

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, 119991, Россия
E-mail: mkoksharov@gmail.com; Tel. +7-495-939-26-52;

Люцифераза светляков катализирует биоломинесцентную реакцию окисления люциферина кислородом воздуха в присутствии АТФ и Mg^{2+} . Благодаря высокой каталитической активности, специфичности к АТФ и простоте регистрации биоломинесцентного сигнала люцифераза светляков применяется в АТФ-метрии, в том числе для определения бактериальных загрязнений различных объектов, используется в качестве гена-маркера экспрессии и в пиросеквенировании. Люцифераза является перспективным инструментом для использования в качестве молекулярного сенсора для определения различных аналитов и изучения белок-белковых взаимодействий, а также в качестве метки в иммуноанализе. Применение нативных люцифераз светляков часто ограничивается их низкой стабильностью при повышенных температурах. В частности, люцифераза светляков *Luciola mingrelica* дико-го типа (WT) при 37°C теряет более половины активности за 50 минут.

На основе анализа пространственной структуры люциферазы *L. mingrelica* были выбраны положения для внесения аминокислотных замен. Двойной мутант G216N/A217L был при 42°C в 18 раз стабильнее люциферазы дико-го типа, но его активность составила только 10% от исходной, а максимум спектра биоломинесценции сместился от 566 до 611 нм. Внесение дополнительной замены S398M позволило получить тройной мутант G216N/A217L/S398M, сохранявший как высокую термостабильность двойного мутанта, так и высокую каталитическую активность, и спектры биоломинесценции, близкие к наблюдаемым для WT-люциферазы.

В случае люцифераз лёгкость детекции биоломинесценции значительно упрощает процедуру скрининга библиотек мутантов по активности, что позволяет эффективно использовать метод случайного мутагенеза для направленного изменения свойств фермента. Было проведено четыре последовательных цикла случайного мутагенеза и скрининга для отбора мутантов с повышенной термостабильностью. В качестве начальной формы был выбран мутант S118C. Наиболее стабильный мутант, полученный в каждом цикле, был использован в качестве исходной формы для следующего. Применяемая методика скрининга мутантов по термостабильности не приводила к гибели клеток *E. coli*, что позволило проводить отбор термостабильных мутантов *in vivo* непосредственно на основе библиотеки колоний *E. coli*, без использования дополнительных реплик. В результате четырёх циклов мутагенеза был получен мутант 4TS, содержащий 8 замен по сравнению с WT-люциферазой. Стабильность мутанта 4TS при 42°C возросла в 65 раз по сравнению с WT-люциферазой (время полуинаktivации увеличилось с 8,5 минут до 10 часов), удельная активность возросла в 1,9 раза, K_m по АТФ уменьшилась в 5,5 раз. Как правило, люциферазы жуков используются в диапазоне температур от комнатной до 37°C. Мутант 4TS через 2 суток сохраняет 70% активности при 37°C, т. е. его стабильность достаточна для большинства практических применений *in vivo* и *in vitro*.

**ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА БРЮШНУЮ НЕРВНУЮ
ЦЕПОЧКУ РЕЧНОГО РАКА: ПРОТЕОМНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Photodynamic treatment of crayfish ventral nerve cord: proteomics study

**КОЛОСОВ М.С., БИБОВ М.Ю., ДЕМЬЯНЕНКО С.В., КОВАЛЕВА В.Д.,
УЗДЕНСКИЙ А.Б.**

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия; E-mail: mskolosov@ya.ru

Фотодинамическая (ФД) терапия перспективный метод лечения злокачественных новообразований, в частности, опухолей мозга. В процессе воздействия, однако, могут повреждаться и здоровые нейроны и глиальные клетки. Для минимизации этого нежелательного процесса необходимо представлять особенности внутриклеточных механизмов ФД повреждения нервной ткани. Мы исследовали изменения экспрессии 224 белков в брюшной нервной цепочке речного рака с помощью протеомных микрочипов Panorama Ab Cell Signalling (Sigma). ФД воздействие алюмофталлоцианина Фотосенс (1 мкМ, 670 нм, 50 Дж/см²) спустя 2 часа после облучения вызывало некроз около 40% глиальных клеток межганглионарных коннектив. При этом более чем на 50% повышался уровень белка Bcl-xL и фосфорилированного (активированного) белка RAF. Одновременно снижались уровни дистрофина и каспазы 9. На 30–50% повышались уровни белка cdc27 и фосфорилированных белков FAK и Pyk2, а также снижалась экспрессия белков p57, циклина D1, десмина, клатрина и ацетилированного гистона H3. Также наблюдалось 35%-снижение уровня фосфорилирования треонина в клеточных белках. Повышение уровня противоапоптотного белка Bcl-xL и снижение уровня каспазы 9 отражало активацию противоапоптотных механизмов. Об этом свидетельствовало и то, что преобладающим типом гибели глиальных клеток был не апоптоз, а некроз. Повышение уровня белка Cdc27, регулирующего митоз, свидетельствовало о пролиферативных процессах в выживших глиальных клетках. На активацию пролиферативных процессов указывало также снижение экспрессии белка p57, который является ингибитором циклин-зависимых киназ, инициирующих G1-S переход клеточного цикла. Однако, снижение уровня циклина D1, контролирующего вход в S-фазу клеточного цикла, указывало на сложные изменения в регуляции клеточного цикла. Повышение уровня фосфорилирования белка RAF, т.е. его активация, свидетельствовало об участии сигнального каскада Raf-MEK-ERK в реакции нервной ткани на ФД воздействие. На активацию сигнальных путей, связанных с изменениями клеточной адгезии указывало фосфорилирование протеинкиназ фокальной адгезии FAK и Pyk2. Об изменениях межклеточных взаимодействий свидетельствовало снижение уровня дистрофина, который в комплексе с гликопротеинами связывает внеклеточный матрикс и цитоскелет, а также снижение уровня десмина, участвующего в формировании контактных зон, и клатрина, участвующего в изгибании мембран и образовании транспортных пузырьков. Снижение уровня фосфотреонина может указывать на участие треониновых фосфатаз в реакции нервной ткани на ФД воздействие. Ацетилирование лизиновых остатков гистонов связывают с активацией транскрипции. Таким образом, ФД воздействие активировало противоапоптотные механизмы, изменяло регуляцию клеточного цикла и вызывало перестройки структурных белков, участвующих в межклеточных взаимодействиях. Поддержано грантами РФФИ (08-04-01322, 11-04-01476), Минобрнауки (16.740.11.0368) и грантом Президента РФ для поддержки молодых российских ученых (МК-6042.2010.4).

**ГЛИАЛЬНЫЙ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЙ ФАКТОР ЗАЩИЩАЕТ НЕЙРОНЫ И
ГЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ РАКА ОТ ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ**
Glial neurotrophic factor protects neurons and glial cells from photodynamic injury

**КОМАНДИРОВ М.А., КНЯЗЕВА Е.А., РУДКОВСКИЙ М.В.,
ФЕДОРЕНКО Ю.П., ФЕДОРЕНКО Г.М., УЗДЕНСКИЙ А.Б.**

Южный Федеральный Университет, Ростов-на-Дону, 344090, Россия. auzd@yandex.ru

Важную роль в реакции тканей на внешние воздействия играют межклеточные взаимодействия. Известно, что нейроны защищают окружающие глиальные клетки от апоптоза, вызванного фотодинамическим (ФД) воздействием. Для этого они могут выделять нейротрофические факторы, распознаваемые рецепторами на поверхности глиальных клеток. Для выяснения возможного участия глиального нейротрофического фактора GDNF в выживаемости фотосенсибилизированных глиальных клеток рака мы исследовали его влияние на ФД-индуцированные изменения ультраструктуры нейронов и окружающих глиальных клеток рака, а также на некроз и апоптоз этих клеток. Фотосенсибилизатором служил аломофталозицин Фотосенс ($10^{-7}M$), источником света – диодный лазер (670 нм, 0,4 Вт/см²). Для выявления некроза и апоптоза клетки флуорохромировали йодидом пропидия и Hoechst 33342. ФД воздействие вызывало некроз нейронов и некроз и апоптоз значительной части глиальных клеток. В присутствии 10 нг/мл GDNF уровень ФД-индуцированного некроза нейронов и глии, а также апоптоза глиальных клеток снижался примерно вдвое по сравнению с опытами в его отсутствие. Электронно-микроскопическое исследование показало, что после получасовой инкубации с GDNF в темноте нейроны содержали много крупных митохондрий с развитыми кристами, что свидетельствовало о высоком уровне энергетического обмена. Обилие цистерн шероховатого эндоплазматического ретикула, и ориентация диктиосом в тельцах Ниссля в сторону пучков микротрубочек указывали на высокий уровень белкового синтеза и внутринейронального транспорта. О транспорте из глии в нейрон свидетельствовало присутствие глиальных выпячиваний в цитоплазму нейрона, соответствующих инвагинаций нейрональной мембраны и субповерхностных цистерн в нейроне. 30-мин ФД воздействие вызывало набухание митохондрий, разрушение их крист и матрикса, набухание субповерхностных цистерн, цистерн эндоплазматического ретикула и диктиосом, снижение сегрегации цитоплазмы на тельца Ниссля. Это свидетельствовало о нарушении биоэнергетических, биосинтетических и транспортных процессов. После 30-мин ФД воздействия в присутствии 10 нг/мл GDNF ультраструктура нейронов и глиальных клеток была более сохранна, чем без него. В теле нейрона сохранялась «тигроидная» морфология, обусловленная разделением цитоплазмы на тельца Ниссля, изобилующие рибосомами, цистернами эндоплазматического ретикула и митохондриями. Большинство митохондрий не было набухшим. В тельцах Ниссля наблюдались шероховатый эндоплазматический ретикулум, множества рибосом и полисом. Диктиосомы, участвующие в сортировке и упаковке клеточных белков, были ориентированы в тельцах Ниссля выходной транс-стороной в сторону пучков микротрубочек. Следовательно, GDNF предохранял биосинтетические и транспортные процессы в нейронах от ФД нарушения, что могло лежать в основе его защитного действия. Работа поддержана грантами РФФИ № 05-04048440, 08-04-01322 и 11-04-0147 и грантом Минобрнауки РФ № 2.1.1/6185.

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ БИОТЕСТЫ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Bioluminescent enzymatic biotests: problems and perspectives

Валентина КРАТАСЮК

Сибирский федеральный университет, пр. Свободный 79, Красноярск, 660041, Россия;
Институт биофизики СО РАН, Академгородок, Красноярск, 660036, Россия
E-mail: VKratsyuk@gmail.com Тел.: +7-391-244-08-41, Факс: +7-391-244-87-90

Современные методы обнаружения опасных веществ обладают рядом существенных недостатков. Так, химический анализ не позволяет определять влияние токсинов на биологические объекты и не указывает на степень опасности этой среды для человека. Биотесты на живых организмах дороги в использовании и дают большую ошибку. При этом из-за длительности анализов и сложности методов, результаты могут быть получены только через несколько дней, что неприемлемо в чрезвычайных ситуациях. Для преодоления этих проблем была выдвинута концепция нового направления биотестирования – люциферазных биотестов токсичности, в которых токсические свойства анализируемых веществ и смесей определяют по их влиянию на биолюминесцентные ферментативные реакции. При этом в качестве тест-объектов вместо светящихся бактерий используются ферменты светящихся бактерий [1]. Это дает целый ряд преимуществ: увеличивается точность и чувствительность анализа, сокращается время анализа, но главное, люциферазный биотест позволяет проводить анализ в смесях, содержащих большое количество органических веществ. Органические вещества, которые служат пищей для живых организмов, делают невозможным биотестирование с использованием живых организмов. Поэтому ферментативные биотесты применяются на предприятиях целлюлозно-бумажной промышленности, а также при анализе коммунальных стоков, богатых органикой. На основе ферментативных биотестов создаются портативные системы для экспрессного предупреждения человека о химико-биологической опасности. Для этого разработана новая технология получения многокомпонентного дозированного стабильного реагента под заказ [2] как для измерений токсичности на широком наборе существующих биолюминометров, так и для портативных устройств и индивидуальных биоанализаторов. Использование такого реагента-сенсора значительно упрощает процедуру измерения и при объединении с портативной измерительной частью позволяет создать биодетектор с характеристиками, превосходящими отечественные и зарубежные аналоги.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (государственный контракт № 02.740.11.0766), Министерства образования и науки Российской Федерации и Американского фонда гражданских исследований и развития (гранты № 2.2.2.2/5309 и RUX0-002-KR-06/ВР4М02), Российской Академии наук (Программа «Молекулярная и клеточная биология»), а также Президента РФ (грант НШ 64987.2010.4).

1. Патент РФ № 2413771. Экспресс-способ биотестирования природных, сточных вод и водных растворов.

Опубл. 10.03.2011/

2. Патент РФ № 2413772. Биолюминесцентный биомодуль для анализа токсичности различных сред и способ его приготовления. Опубл. 10.03.2011.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ОРГАНИЗМЫ

Use of bioluminescence to study the effects of ionizing radiation on organisms

Надежда КУДРЯШЕВА^{1,2}, Мария АЛЕКСАНДРОВА², Татьяна РОЖКО²,
Валерия АРХИПОВА²

¹Институт биофизики СО РАН, Красноярск, 660036, Россия;

E-mail: n_qdr@yahoo.com; Fax: +7-391-243-43-00;

²Сибирский Федеральный Университет, Красноярск, 660041, Россия

Морские светящиеся бактерии и их ферментативные реакции уже несколько десятилетий используются в качестве биотестовых систем для мониторинга токсичности различных сред. В качестве тестовой физиологической функции используется интенсивность их люминесценции. Светящиеся бактерии являются удобными объектами для изучения механизмов воздействия радиации на организмы. Использование бактерий и ферментативных реакций дает возможность сравнения эффектов радиации на клеточном и биохимическом уровнях.

Исследовано хроническое воздействие на люминесценцию бактерий и их ферментативных реакций альфа-излучающего нуклида – Am-241 (до 6 кБк/л) и бета-излучающего нуклида – трития (до 100 МБк/л). Показано, что радионуклиды влияют на кинетику биолюминесценции унифицированным образом: обнаружены три стадии воздействия радионуклидов: (1) отсутствие эффекта, (2) активация, (3) ингибирование биолюминесценции. Эти стадии можно приписать известному отклику организма на стресс-факторы, включающему соответственно стадии (1) распознавания стресс-фактора, (2) гормезиса, т.е. интенсификации процессов в ответ на малое стрессовое воздействие и (3) подавление физиологических функций.

На примере трития показано, что усложнение системы от ферментов к клеткам приводит к увеличению устойчивости к деструктивному влиянию радионуклида.

Проведено сравнение эффектов альфа-излучающих радионуклидов высокой (Am-241) и низкой (U-235+238) удельной активности. Продемонстрирован рост (до 400%) и ингибирование свечения при воздействии Am-241. Эти эффекты проявлялись при низких концентрациях америция (10^{-11} М, 100 Бк/л). Эффект урана был сходен с эффектами стабильных тяжелых металлов (Eu, Fe): наблюдалось только ингибирование свечения при более высоких концентрациях металлов ($>10^{-7}$ М). Т.о., радиационная токсичность, в отличие от химической, проявляется при низких концентрациях металлов и характеризуется эффективной активацией, предшествующей ингибированию свечения.

Т.к. в качестве вторичных продуктов радиоактивного распада в водных средах могут образовываться перекисные соединения, рассмотрена их роль при изменении свечения бактерий в растворах радионуклидов. С помощью люминольного хемилюминесцентного метода показано, что содержание перекисей в растворах Am-241 превышает фоновое, а в растворах урана и трития – нет. Выявлены сходства в кинетике люминесценции бактерий в присутствии H₂O₂ и Am-241 – наличие периодов активации и ингибирования свечения. Т.о., перекисные соединения, вероятно, вносят вклад в воздействие Am-241 на свечение бактерий. Отсутствие перекисей в тритий-содержащих растворах указывает на важную роль и других процессов, увеличивающих ионизацию среды.

**ВЯЗКОСТЬ В КЛЕТКАХ:
ОТ МОЛЕКУЛЯРНЫХ РОТОРОВ ДО ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ**
**Measuring intracellular viscosity:
from molecular rotors to Photodynamic Therapy of cancer**

Марина КУИМОВА

Department of Chemistry, Imperial College London, Exhibition Road, SW7 2AZ, UK
E-mail: m.kuimova@imperial.ac.uk; URL: <http://www3.imperial.ac.uk/people/m.kuimova>

Вязкость является одним из основных параметров, определяющих скорость диффузионных процессов. Вязкость играет важную роль в таких клеточных процессах, как передача сигналов, массоперенос, включая направленную доставку соединений, обладающих физиологической активностью. Следует отметить, что в медицинских исследованиях была обнаружена зависимость между изменениями вязкости в клетках и заболеваниями организма. Несмотря на важность определения вязкости в такого рода системах, ее измерение на уровне единичной клетки представляет сложную задачу.

В докладе рассмотрен новый метод измерения вязкости в клетке с помощью флуоресцентных меток, – так называемых, “молекулярных роторов”. Электронная структура “роторов” такова, что параметры их флуоресценции (время жизни, спектры) сильно зависят от вязкости окружающей среды [1–3]. С помощью этого метода нам удалось показать, что вязкость в разных областях клеточных органелл различна. Одним из наиболее важных результатов стало то, что в гидрофобных органеллах вязкость может достигать 100 сП, то есть, в 100 раз превышать значения в воде и в цитоплазме клетки [1–3]. Такая высокая клеточная вязкость оказывает заметное влияние на скорость диффузионно-контролируемых реакций в клетке и это было экспериментально показано на примере процессов образования и реакций синглетного кислорода $O_2(a^1\Delta_g)$ в клетках [4].

Показано, что клеточная вязкость значительно возрастает в процессе апоптоза клетки, вызванном облучением при фотодинамической терапии [2]. Увеличение вязкости влияет на кинетику образования и гибели синглетного кислорода в клетке и позволяет контролировать эффективность фотодинамической терапии в вязких средах [5]. В докладе также будет рассмотрено использование молекулярных роторов для двухфотонной фотодинамической терапии [6].

1. M. K. Kuimova, G. Yahioglu, J. A. Levitt, K. Suhling, *J. Amer. Chem. Soc.*, 2008, 130, 6672

2. M. K. Kuimova, et al, *Nature Chem.*, 2009, 1, 69

3. J. A. Levitt, et al, *J. Phys. Chem. C*, 2009, 113, 11634

4. M. K. Kuimova, G. Yahioglu, P. R. Ogilby, *J. Amer. Chem. Soc.*, 2009, 131, 332

5. M. K. Kuimova, M. Balaz, H. L. Anderson, P. R. Ogilby, *J. Amer. Chem. Soc.*, 2009, 131, 7948

6. H. A. Collins, et al *Nature Photonics*, 2008, 2, 420-425;

**МЕХАНИЗМЫ ИММУНОСУПРЕССОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОДУКТОВ
ФОТООКИСЛЕНИЯ ПСОРАЛЕНОВ НА РЕАКЦИЮ КОНТАКТНОЙ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ У МЫШЕЙ**

**Mechanisms of the immunosuppressive action of psoralen photooxidation products
on contact hypersensitivity in mice**

**Алла КЯГОВА, Светлана ПАВЛОВА, Диана АЛБЕГОВА, Илья ПЯТНИЦКИЙ,
Людмила КОЗЫРЬ, Наталия ВЛАСОВА, Александр ПОТАПЕНКО**

Российский Государственный Медицинский Университет, Москва, ул. Островитянова 1, 117997, Россия;
E-mail: kyagova_alla@front.ru; FAX: +7-495-246-71-75

Псораленовая фотохимиотерапия (ПУВА-терапия и фотоферез) успешно используются для лечения ряда кожных и аутоиммунных заболеваний, обусловленных гиперреактивностью Т-клеточного звена иммунитета. Предполагается, что терапевтический эффект псораленовой фотохимиотерапии основан на индукции специфической системной иммуносупрессии. Ранее нами было показано, что продукты фотоокисления псораленов (ФОП), образующихся в ходе фотохимических реакций типа IV, могут вносить вклад в иммуносупрессорное действие псораленовой фотохимиотерапии. Однако, иммунные механизмы супрессорного действия ФОП остались не ясными.

Механизмы иммуносупрессорного действия ФОП были изучены на модели реакции контактной гиперчувствительности (КЧ) к динитрофторбензолу (ДНФБ) у мышей. Показано, что внутривенное или пероральное введение ФОП через 24 часа после сенсibilизации мышей ДНФБ приводило к уменьшению абсолютного количества клеток в регионарных лимфоузлах (ЛУ) и снижению их пролиферативной активности, оцененной по включению радиоактивной метки ³H-тимидина. Снижение пролиферативной активности лимфоузлов сопровождалось изменением цитокинового баланса: после перорального введения ФОП наблюдалось достоверное уменьшение секреции ИЛ-2, ИЛ-4 и ИФН γ (на 38%, 54% и 52%, соответственно) и увеличение на 22% ИЛ-17 клетками регионарных лимфоузлов по сравнению с ДНФБ-сенсibilизированным контролем. Эффект ФОП при его внутривенной инъекции на цитокиновый профиль проявлялся слабее, чем при его пероральном введении. Изменение цитокинового баланса может свидетельствовать о переключении Th1 и Th2 иммунных ответов в процессе развития КЧ на формирование Th17-лимфоцитов при действии ФОП. В опытах по адоптивному переносу спленоцитов от ДНФБ-сенсibilизированных мышей доноров мышам-реципиентам, предварительно сенсibilизированных гаптенами ДНФБ или оксазолоном, обнаружено, что пероральное или внутривенное введение ФОП на афферентной стадии развития КЧ приводит к генерации клеток со специфическими супрессорными свойствами. Методом иммуномагнитной сепарации выявлено, что часть супрессорных клеток, генерированных при действии ФОП *in vivo* относятся к популяции CD4⁺-лимфоцитов.

Наши результаты доказывают, что продукты фотоокисления псораленов обладают иммунорегуляторными свойствами и механизмы их иммуносупрессорного действия в основных чертах совпадают с таковыми для ПУВА-терапии и фотофереза.

ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА ТРОМБИНА ИЗ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА Internal dynamics of human thrombin

Светлана ЛОЗНИКОВА¹, Дмитрий ЩЕРБИН¹, Александр СУХОДОЛА²,
Николай БОРИСЕВИЧ²

¹Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, г. Минск, 220072, Беларусь; ул. Академическая 27
E-mail: s_loznikova@mail.ru; Fax: +375-17-284-23-59;

²Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси, г. Минск, 220072, Беларусь

В настоящее время тромбин является объектом интенсивного изучения в различных областях биологии и медицины. Биологические свойства белков тесно связаны с их конформацией и внутримолекулярной динамикой (ВМД). В то время как в Protein Data Bank имеется 3D структура тромбина, его ВМД практически остается неизученной.

В работе представлены результаты исследования медленной (миллисекундной) ВМД тромбина из крови человека в растворе методом триптофановой флуоресценции при комнатной температуре (ТФКТ). Возможность анализа медленной ВМД методом ТФКТ базируется на существовании выраженной зависимости значений времени жизни (τ) флуоресценции от молекулярной подвижности окружения хромофора и соответственно длительности ТФКТ характерным временам низкочастотных флуктуаций структуры белка в местах локализации триптофанилов [1].

Нами впервые обнаружена способность к ТФКТ тромбина («Sigma», США). Показано, что спектр ТФКТ белка имеет характерный для других триптофаносодержащих объектов вид трехзубца с максимумами в областях 417 нм, 445 нм и 465 нм. Кинетика затухания ТФКТ тромбина удовлетворительно аппроксимировалась суммой двух экспоненциальных компонентов с временами жизни быстрого $\tau_1 = 80,0 \pm 7,27$ мс, медленного $\tau_2 = 341,6 \pm 27,9$ мс компонентов. На основании рентгеноструктурных данных файл 1PRV Protein Data Bank с помощью программы «RasMol» проведен анализ особенностей локализации триптофановых остатков тромбина, идентифицированы триптофанилы, ответственные за ТФКТ белка.

Как известно, у подавляющего большинства белков в растворе миллисекундная ТФКТ не регистрируется [1]. Это объясняется эффективным динамическим тушением триптофановой флуоресценции, обусловленным существованием в белках выраженных тепловых флуктуаций конформационных элементов глобулы с миллисекундными характерными временами. Лишь в тех относительно редких случаях, когда медленная ВМД белков в растворе существенно заторможена, они проявляют способность к миллисекундной ТФКТ. Выраженная способность тромбина к ТФКТ свидетельствует о том, что его медленная ВМД существенно ограничена по сравнению с большинством водорастворимых белков.

Таким образом, методом ТФКТ обнаружена высокая конформационная жесткость тромбина, существенно превышающая таковую большинства водорастворимых белков.

1. Reviews in Fluorescence 2008. Springer. 1st Edition. 2010. Vol. 5. P. 37-67.

**ПРИМЕНЕНИЕ КОНЬЮГАТОВ ЛЮЦИФЕРАЗЫ СВЕТЛЯКОВ
LUCIOLA MINGRELICA С БИОСПЕЦИФИЧНЫМИ БЕЛКАМИ
В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ**
**The application of *Luciola mingrelica* firefly luciferase conjugates with biospecific
proteins in the immunoassay**

Галина ЛОМАКИНА, Елена ВАСЬКОВА, Наталья УГАРОВА

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва,
119992, Россия
E-mail: lomakinagalina@yahoo.com; факс: (495) 939-26-60

Разработан метод ковалентной модификации люциферазы *Luciola mingrelica* через поверхностные SH-группы остатков цистеина фермента и NH₂-группы биоспецифичного белка с помощью гетеробифункционального сшивающего агента N-сукцинимидного эфира 3-(2-пиридилдитио)пропионата. Для конъюгации использованы ферменты с His₆-tag на C-конце, отличающиеся количеством поверхностных SH-групп – люцифераза дикого типа (WT), содержащая три SH-группы, и ее термостабильный мутант 4TS с двумя SH-группами, у которого один из поверхностных остатков, а именно Cys146, играющий критическую роль в окислительной инактивации фермента, заменен на Ser. Показано, что время реакции зависит от количества доступных SH-групп - отсутствие у мутанта 4TS остатка Cys146, наиболее удобного для модификации, привело к значительному увеличению времени реакции. Впервые получены активные и стабильные конъюгаты люциферазы с биоспецифичными белками - БСА и авидином из куриных яиц состава 1:1 и 1:2 с высоким выходом - по данным электрофоретического анализа доля немодифицированной люциферазы составляла менее 1%. Конъюгация привела к улучшению каталитических свойств фермента: K_м по АТФ снизилась в 4 раза для BSA-4TS и не изменилась для Avi-4TS, K_м по LH2 снизилась в 5 раз для Avi-4TS и возросла в 2,5 раза для BSA-4TS по сравнению с немодифицированным 4TS. Отмечено увеличение стабильности полученных конъюгатов.

Оптимизированы условия определения низких концентраций конъюгатов люциферазы – предел обнаружения фермента не зависел от степени его модификации и составил 10⁻¹³М. Достоинством полученных конъюгатов на основе термостабильного фермента является возможность их использования при повышенных температурах без потери активности, что значительно сокращает время анализа. Конъюгат BSA-4TS был успешно апробирован в конкурентном иммуноферментном анализе для определения микроколичеств альбумина в диапазоне концентраций 5–300 мкг/мл, требуемых для выявления микроальбуминурии, а конъюгат Avi-4TS – для детекции клеток *Salmonella typhimorium* с помощью биотинилированных антител с пределом обнаружения 10⁵ КОЕ/мл.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК МНОГОКОМПОНЕНТНОЙ
БИФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ
НАДН:ФМН-ОКСИДОРЕДУКТАЗА-ЛЮЦИФЕРАЗА ИММОБИЛИЗОВАННОЙ
СОВМЕСТНО СО СТАБИЛИЗАТОРАМИ ФЕРМЕНТОВ
Characteristics of coupled enzymatic system NADH:FMN-oxidoreductase-luciferase
co-immobilized into starch gel with substrates and stabilizers**

Виктория ЛОНШАКОВА¹, Елена ЕСИМБЕКОВА^{2,4}, Валентина КРАТАСЮК^{1,2}

¹Сибирский федеральный университет, Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, 660041, Россия, г. Красноярск, пр. Свободный, 79
VKratasyuk@gmail.com

²Институт биофизики СО РАН, 660036, Россия, г. Красноярск, ул. Академгородок, 50
Esimbekova@yandex.ru

Для решения задач экологического мониторинга широко применяются методы с использованием реагентов, основанных на ферментах светящихся бактерий. Наиболее перспективным является препарат, представляющий собой включенную в крахмальный гель биферментную систему светящихся бактерий совместно с субстратами (миристиновым альдегидом и НАДН). Однако иммобилизованный реагент при хранении (~1 год при 4°C) теряет активность почти в 5 раз. Внесение в его состав специализированных добавок может привести к дополнительной стабилизации ферментов, что позволит улучшить характеристики многокомпонентного иммобилизованного реагента.

Цель данной работы – разработка многокомпонентного иммобилизованного реагента включающего биферментную систему светящихся бактерий НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза и ее субстраты, отличающегося высокой активностью и длительным сроком хранения при обеспечении высокой чувствительности к действию токсических веществ.

Варьировали содержание в реагенте стабилизаторов (дितिотреитол (ДТТ), бычий сывороточный альбумин (БСА), меркаптоэтанол (МЭ)). Реагент представляет собой высушенный диск диаметром 6–7 мм, сухой вес $1,5 \pm 0,2$ мг.

Показано, что включение в состав иммобилизованного реагента стабилизаторов ферментов позволяет увеличить интенсивность свечения реагента. Наибольший эффект оказывает БСА. Включение его в состав реагента позволяет увеличить интенсивность свечения в 9 раз. При включении в состав реагента ДТТ или МЭ интенсивность свечения увеличивается в 1,5 раза. Однако наблюдалось изменение активности реагента после 6 месячного хранения при температуре 4°C. Стабилизирующий эффект проявлялся при добавлении БСА или ДТТ. МЭ видимого стабилизирующего действия не оказал. Также показано, что внесение в состав реагента стабилизаторов снижает его чувствительность к действию модельных токсических веществ (CuSO_4 и бензохинон). Исключение составляет реагент, содержащий $1 \cdot 10^{-4}$ М ДТТ, где остаточная интенсивность свечения в присутствии токсических веществ не отличалась от контрольной.

Таким образом, наибольший стабилизирующий эффект при сохранении чувствительности к действию токсических веществ наблюдается при внесении в иммобилизованный реагент $1 \cdot 10^{-4}$ М ДТТ.

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ РЕПОРТЕРЫ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ИОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПРОЦЕССОВ В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ

Bioluminescent reporters for imaging of molecular processes *in vivo*

Светлана **МАРКОВА**, Евгений **ВЫСОЦКИЙ**

Институт Биофизики СО РАН, Академгородок 50, Красноярск, 660036, Россия
E-mail: svetlana@ibp.ru; Fax: +7-3912-43-34-00;

Биолюминесценция – излучение света живыми организмами в результате окисления различных субстратов специализированными клеточными ферментами. Сфера применения биолюминесценции среди неинвазивных имиджинговых технологий для мониторинга молекулярных процессов *in vivo* в живых организмах, в том числе в целых животных, интенсивно расширяется. Это происходит благодаря развитию высокочувствительной регистрирующей аппаратуры и уникальным свойствам биолюминесцентных репортеров, среди которых отсутствие токсичности (биолюминесценция – естественная функция живой клетки) и широчайший линейный диапазон регистрации. Основными биолюминесцентными репортерами, используемыми для биоимиджинга живых организмов, на сегодняшний день являются два типа совершенно различных по своей природе люцифераз, использующие различные субстраты: светлячковая и ее гомологи (~62 kDa) и *Renilla* люцифераза (~32 kDa). Перспективными репортерами также являются недавно клонированные гомологичные люциферазы из копепод *Gaussia* (~20 kDa) и *Metridia* (18–22 kDa), использующие целентеразин как субстрат подобно *Renilla* люциферазе. Сравнительный анализ свойств имеющихся на сегодняшний день биолюминесцентных репортеров показывает, что каждый из репортеров имеет существенные недостатки, ограничивающие дальнейшее развитие биолюминесцентных имиджинговых технологий живых объектов. Таким образом, дальнейшие задачи включают (1) совершенствование имеющихся репортеров методами белковой инженерии, (2) совершенствование биолюминесцентных субстратов, являющихся эмиттерами излучения, а также (3) получение совершенно новых биолюминесцентных репортеров из природных источников.

Одной из основных проблем для биолюминесцентных репортеров является неоптимальный спектр излучения, где большая часть излученных фотонов не попадает в «окно прозрачности» биологических тканей в районе ~650 нм. Особенно это актуально для «голубых» *Renilla* и копеподных люцифераз. Нами получены мутанты люцифераз из *Renilla muelleri* и *Metridia longa* со сдвигом эмиссионных спектров в красную область. При использовании модифицированного субстрата сдвиг спектра для мутантной *Renilla muelleri* люциферазы составил ~90 нм.

Анализ молекулярных данных по исследованному биолюминесцентной системе выявил, что удивительной особенностью биолюминесценции является то, что это явление возникало много раз независимо в ходе эволюции (более 30 раз). Из имеющихся данных следует, что при этом, на роль биолюминесцентных белков рекрутировались самые различные ферменты из предковых биохимических путей. Несмотря на имеющееся разнообразие биолюминесцентных систем, исследовано, а тем более клонировано совсем немного биолюминесцентных белков. Таким образом, исследования новых биолюминесцентных систем очень перспективны для поиска и создания совершенно новых биолюминесцентных репортеров.

**СОЗДАНИЕ МЕТОДИКИ СКРИНИНГА АГЕНТОВ
ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ РАКА
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КРАСНЫХ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ БЕЛКОВ**
**Development of a technique of the screening of agents
for photodynamic therapy of cancer using red fluorescent protein**

**Ирина МЕЕРОВИЧ, Виктория ЖЕРДЕВА, Наталия КАЗАЧКИНА,
Александр САВИЦКИЙ**

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН,
Москва, 119071, Россия; E-mail: imeerovich@inbi.ras.ru; Fax: +7-495-954-27-32

Эффективность фотодинамического повреждения биологической ткани при фотодинамической терапии (ФДТ) определяется главным образом уровнем накопления фотосенсибилизатора (ФС), его локализацией в ткани и фотохимической активностью. Одной из проблем ФДТ является повышение селективности накопления ФС в опухоли. Для уменьшения побочных эффектов, вызванных накоплением ФС в ряде здоровых органов и тканей организма (печени, селезенке, почках, а также в коже), для каждого ФС определить оптимальные условия для проведения ФДТ, в частности, необходимо изучить динамику уровня накопления ФС в опухоли и нормальной ткани.

Опухолевые модели, созданные с использованием опухолевых клеток, экспрессирующих цветные флуоресцирующие белки (fluorescent proteins – FPs), позволяют исследовать развитие первичных опухолей и метастазов, а также ответ опухоли на лекарственную терапию в режиме реального времени [1]. Использование FP-меченых опухолей для целей ФДТ открывает дополнительные возможности при изучении механизма действия фотосенсибилизаторов и эффективности ФДТ.

В данной работе в качестве опухолевой модели использовались подкожно перевитые мышам линии BalbC/Nu опухолевые клетки меланомы mel Kog, экспрессирующие красный флуоресцирующий белок TurboRFP (mel Kog-TurboRFP [2]), используемые фотосенсибилизаторы характеризовались флуоресценцией в длинноволновой области спектра, например, бактериохлорин или производное фталоцианина “Тиосенс”, что позволяет изучать распределение ФС *in vivo* на большей глубине в организме лабораторного животного. При изучении фармакокинетики ФС у мышей с флуоресцирующими опухолями при помощи автоматизированной системы iBox (UVP, USA) были получены флуоресцентные изображения как флуоресцирующей опухоли, так и распределения ФС. Таким образом, что накопление липосомального “Тиосенса” в опухоли достигает максимума через сутки после внутривенного введения ФС, в этот момент этом удается достичь контраста накопления, равного 3. Было показано, что накопление трикалциевой соли бактериохлорина в опухоли является максимальным в течение нескольких часов после введения, однако не удается достичь значительного контраста накопления по сравнению с окружающими здоровыми тканями (например, контраст не превышает 1,5–1,7 как в случае внутрибрюшинного, так и в случае внутривенного введения ФС). Путем диффузной флуоресцентной томографии показано уменьшение объема опухоли после фотодинамического воздействия на опухоль mel Kog-TurboRFP, сенсibilизированной липосомальным “Тиосенсом”.

1. Hoffman, R.M., *Journal of Biomedical Optics*, 2005, 10(4), 41202.

2. I.G. Meerovich, L.R. Arslanbaeva, M.M. Shigreva, D.V. Sokolova, O.S. Burova, N.V. Andronova, E.M. Treshalina, A.Yu. Baryshnikov, and A.P. Savitsky, *Proc. II International symposium Topical problems of biophotonics*, Nizhny Novgorod, 2009, p. 63.

**ВЛИЯНИЕ ПОЛИГИСТИДИНОВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
НА СВОЙСТВА ЛЮЦИФЕРАЗЫ СВЕТЛЯКОВ *L. MINGRELICA*,
СОДЕРЖАЩЕЙ ЗАМЕНЫ ОСТАТКОВ ЦИСТЕИНА**
**His-tag impact on properties of *L. mingrelica* firefly luciferase
with cysteine residues substitutions**

Юлия МОДЕСТОВА, Галина ЛОМАКИНА, Наталья УГАРОВА

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 119992, Россия
E-mail: jmodestova@yahoo.com; Fax: +7-495-939-26-60

Люцифераза светляков (ЕС 1.13.12.7) – это фермент, катализирующий люминесцентную реакцию окисления D-люциферина светляков под действием кислорода воздуха. В состав молекулы люциферазы *L. mingrelica* входят 8 свободных остатков цистеина, ни один из которых не принимает участия в ферментативном катализе. Инактивация люциферазы светляков является сложным процессом, первая стадия которого является быстрой и необратимой, вторая – медленной и частично обратимой. При этом стабильность фермента повышается при увеличении его концентрации, что характерно для олигомерных белков. Ранее было показано, что введение единичных замен Cys62Ser, Cys146Ser и Cys164Ser в молекулу рекомбинантной люциферазы, не содержащей полигистидиновую последовательность, приводит к стабилизации фермента на медленной стадии термоинактивации, предположительно за счет снятия эффекта окислительной инактивации, а также уменьшает концентрационную зависимость стабильности люциферазы [1].

На основе плазмиды pETL7 [2], содержащей ген люциферазы светляков *Luciola mingrelica*, несущей His₆-последовательность на С-конце, были получены мутантные формы люциферазы, содержащие единичные замены Cys62Ser, Cys62Val, Cys146Ser и Cys164Ser. Были изучены физико-химические свойства исходной формы люциферазы с С-концевой His₆-последовательностью и полученных на её основе мутантных форм. Показано, что введение полигистидиновой последовательности приводит к существенным изменениям процесса термоинактивации всех изученных форм люциферазы. Процесс инактивации люцифераз с С-концевой His₆-последовательностью является одностадийным, причем $k_{\text{ин}}$ мутантных ферментов совпадают в пределах погрешности с $k_{\text{ин}}$ соответствующих мутантов, не содержащих His₆-последовательности, наблюдаемой при повышенной концентрации фермента (10^{-6} М). Кроме того, за счет введения His₆-последовательности происходит увеличение $K_{\text{м}}^{\text{АТФ}}$ и $K_{\text{м}}^{\text{LH}_2}$ исходной формы люциферазы, что может быть связано с тем, что подвижная His₆-последовательность создает стерические препятствия при изменении взаимной ориентации доменов люциферазы, происходящем при взаимодействии фермента с субстратами.

Таким образом, введение С-концевой His₆-последовательности оказывает существенное влияние на свойства исходной и мутантных люцифераз, в том числе на ход процесса олигомеризации фермента.

1. Modestova, Y.A., Lomakina G.Y., Ugarova N.N., *Luminescence*, 2010, 25, 161.

2. Koksharov M.I., Ugarova N.N., *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2011, DOI: 10.1039/c0PP00318b.

ОСОБЕННОСТИ ФОТОБИОМОДИФИКАЦИИ ШИРОКОПОЛОСНЫМ СВЕТОМ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ КРЫС ПОСЛЕ ИШЕМИИ МИОКАРДА И АСФИКСИИ

The features of photobiomodification produced by wide-band light in the rat cardiovascular system after myocardial ischemia and asphyxia

Виктор **МОНИЧ**¹, Анна **БАВРИНА**¹, Светлана **МАЛИНОВСКАЯ**¹,
Валерий **ЛАЗУКИН**¹, Евгений **ДРУЖИНИН**², Юрий **СИЗОВ**³

¹ГОУ ВПО Нижегородская Государственная Медицинская Академия, Н.Новгород, пл. Минина, 10/1, 603005, Россия;

E-mail: vamm@list.ru; Fax: +7-831-465-50-51;

²ГУЗ Нижегородский областной онкологический диспансер, Н.Новгород, 603126, Россия;

³Коминтек НН, Н.Новгород, 603057, Россия;

Ишемия миокарда и последующая реперфузия вызывают хорошо известные эффекты нарушения характеристик сократительной активности сердца, обусловленные

накоплением в кардиомицитах активных форм кислорода [1]. Известно также, что последствия ишемии/реперфузии можно существенно снизить введением в перфузионную жидкость СОД [2] или реактивацией СОД с помощью облучения сердца низкоинтенсивным красным светом [3].

В данной работе проведено изучение морфологических изменений, происходящих в результате ишемии/реперфузии открытого сердца крыс и последующего экспонирования сердца излучением лазера и широкополосным светом. Проведено сравнение с данными для контрольной (где проводилось ложное облучение) и интактной (где ишемия не моделировалась) групп. Анализ микрофотографий показал, что у животных контрольной группы в большинстве капилляров имели место микроклазматы, состоящий в нарушении структуры эндотелиального слоя (появлении длинных микровыростов) и набухание базального слоя. Митохондрии находились в состоянии набухания, с деструкцией и дезориентацией крист. В кардиомиоцитах крыс, облученных светом лазера, обнаружены микроклазматы, уменьшение диаметра капилляров и деструктивные изменения митохондрий с гиперплазией мелких митохондрий. Матрикс митохондрий был просветлен, в нем выявлялись аморфные и внутрикристные включения. Площадь СПР (саркоплазматического ретикулума) была увеличена в 6,5 раз по отношению к интактным образцам, и в 2,6 раза, по отношению к контрольным. В образцах, облученных широкополосным светом, диаметр капилляров восстанавливался к 5-й минуте воздействия. Внутриклеточного отека кардиомиоцитов не обнаружено. Средняя площадь СПР восстанавливалась до уровня, наблюдавшегося в интактных образцах. Митохондрии имели меньшую среднюю, по сравнению с контролем, площадь. Возможно, митохондрии, с сохраненной структурой, являются новообразованными, что свидетельствовало бы о стимуляции репаративных процессов в кардиомиоцитах.

1. McCord, J. M. *Free Rad. Biol. Med.*, 1988, 4, 9.

2. Vladimirov Yu. A., Osipov A. N., and Klebanov G. I. *Biochemistry*, 2004, 69(1), 81.

3. Малиновская С.Л., Монич В.А., Артифксцова А.П. *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.*, 2008, 145 (5), 509.

**АНТИМИКРОБНОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ
И ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ НАНОЧАСТИЦ**
Antimicrobial effect of metallic and semiconductor nanoparticles

Виктор НАДТОЧЕНКО¹, Марина РАДЦИГ², Инесса ХМЕЛЬ²

¹ Учреждение Российской академии наук Институт проблем химической физики РАН, 142432, г. Черноголовка, просп. Семенова, 1

² Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Курчатова, 2
E-mail: nadto@icp.ac.ru

В работе обобщены результаты исследований действия наночастиц благородных металлов и широкозонных полупроводников на микро-организмы в темновых условиях и при возбуждении наночастиц светом. Рассмотрены современные представления о биохимических механизмах влияния наночастиц серебра на бактерии, сравнительно с действием ионов серебра. Обсуждаются фототермальный и фотокаталитический антимикробные эффекты металлических и полупроводниковых наночастиц.

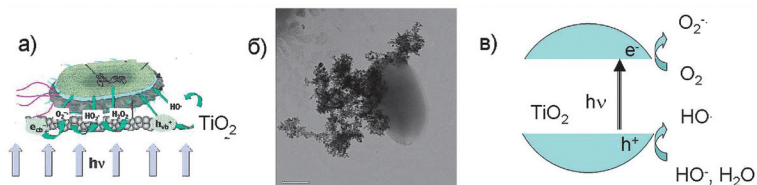


Рисунок 1. а) Схематическое изображение бактериальной клетки на поверхности пористой пленки TiO_2 при облучении УФ-А светом; б) изображение агломерата наночастиц TiO_2 в контакте с поверхностью клетки *E. coli*, полученное с помощью трансмиссионного электронного микроскопа; в) схема фотокаталитического акта с участием наночастиц TiO_2

ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗОНАНСНОГО СВЕТОРАССЕЯНИЯ ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ АГРЕГАТОВ КРАСИТЕЛЕЙ: АГРЕГАЦИЯ И ФОТОХИМИЯ МЕРОЦИАНИНА 540

Application of resonance light scattering for investigation of aggregation of dyes: aggregation and photochemistry of Merocyanine 540

Александр ПОТАПЕНКО, Татьяна ШМИГОЛЬ, Елена КОЖИНОВА,
Андрей ТИХОМИРОВ, Алла КЯГОВА, Михаил МАЛАХОВ

Российский государственный медицинский университет, Москва, 117997, Россия;
E-mail: potapenkoalexander@hotmail.com; Fax: +7-499-246-71-75

Наиболее чувствительным и селективным методом для изучения агрегации красителей является резонансное светорассеяние (РСР) – это явление резкого усиления рэлеевского рассеяния света в области полосы поглощения агрегированных молекул красителей. Свойственно растворам сильно поглощающих хромофоров, образующих крупные агрегаты, в которых устанавливается экситонное взаимодействие между π -электронными системами молекул красителя. Мероцианин 540 (МЦ540) – анионный фотодинамический сенсibilизатор, спектральные и фотохимические свойства которого сильно зависят от присутствия солей. В дистиллированной воде МЦ540 существует в форме мономеров и димеров. Ни мономеры, ни димеры не дают сигналов РСР. При добавлении солей устанавливается равновесие между ионизированными (включая мономеры и димеры) и недиссоциированными формами МЦ540. Показано, что в солевых растворах существует критическая концентрация агрегации (ККА), если концентрация соли превышает ККА, то начинается агрегация МЦ540, и возникает сигнал РСР. Величина ККА зависит как от концентрации МЦ540, так и от валентности катионов соли. В водных растворах 8 мкМ МЦ540 величина ККА для солей одно-, двух- и трехвалентных катионов составляла 300 мМ, 20 мМ и около 0,01 мМ, соответственно, что согласуется с правилом Шульце-Гарди.

Показано, что в растворах солей одновалентных катионов произведение ККА соли на концентрацию МЦ540 (произведение растворимости) является константой, равной $K_{sp} = (1.52 \pm 0.10) 10^{-6} \text{ M}^2$. Когда произведение концентраций МЦ540 и соли ниже K_{sp} , краситель присутствует в ионизированной форме и не формирует агрегаты. Если это произведение превышает K_{sp} , то формируются электро-нейтральные формы красителя, склонные из-за отсутствия электростатического отталкивания к формированию обнаруживаемых методом РСР агрегатов.

В присутствии солей моно- и двухвалентных катионов в концентрациях слегка выше ККА возникают агрегаты с максимумами полос РСР около 533 и 500 нм, практически совпадающими с максимумами поглощения мономеров и димеров МЦ540. При добавлении небольших количеств Al^{3+} (чуть выше ККА) возникает не менее пяти полос РСР с максимумами около 416, 474, 544, 600 и 654 нм. В концентрированных растворах солей любых катионов возникает полоса РСР с близко расположенными интенсивными максимумами около 514 и 532 нм и небольшим плечом около 580 нм.

В агрегированном состоянии резко (в десятки раз) увеличивается скорость фотовыцветания МЦ540, а также скорость фотосенсибилизированной МЦ540 гибели бактериальных клеток. Эти данные указывают на возможность индуцированного добавлением солей переключения механизма фотосенсибилизации с фотогенерации МЦ540 синглетного кислорода на свободнорадикальный.

**БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ
ИНСОЛЯЦИИ КРАСНОГО ДИАПАЗОНА
Biophysical mechanisms of adaptive insolation in red band**

В.Е ПРОКОПЬЕВ¹, В.В. УДУТ²

¹Институт сильноточной электроники СО РАН, Томск, 634055, пр. Академический 2/3, РФ;

²Институт фармакологии СО РАМН, Томск, 634028, г. Томск, пр. Ленина 3, РФ

Несмотря на большое количество работ по влиянию низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) на биологические структуры различного уровня, вопрос о механизмах первичных фотофизических и фотобиологических процессов, определяющих биологическое и терапевтическое действие этого излучения, остается открытым и является предметом многочисленных дискуссий. Молекулярно-клеточные и фотобиологические механизмы лечебного действия НИЛИ обсуждаются сейчас в литературе лишь на уровне гипотез, многие из которых противоречивы и умозрительны, и не имеют экспериментальных доказательств наличия первичных хромофоров и т.д.

В настоящем докладе на основе анализа результатов лабораторных и клинических исследований характеристик цельной крови и её компонентов, модельных клеточных популяций, а также нейроэндокринного, иммунологического, гемостазиологического гомеостазов и общего адаптационного синдрома при внутривенном облучении крови больных язвенной болезнью желудка красным светом, обсуждаются основные биофизические механизмы и процессы приводящие к положительному терапевтическому эффекту.

1. Максимум функции спектрального распределения Планка для фотонов солнечного излучения на поверхности Земли приходящий на длины волн 600÷700нм, совпадает с максимумом полосы поглощения протопорфирина IX (ППИХ), накапливающегося в мембранах патологически изменённых и старых клеток, а также с терапевтическим окном прозрачности кожи и цельной крови. Общая доза света, поглощаемая циркулирующей периферической кровью через открытый участок кожи площадью 100–1000 см² в диапазоне спектра 600÷700 нм в течение светового времени суток в средних широтах составляет около нескольких джоулей.

2. Основу механизма действия низкоинтенсивного внутрисосудистого лазерного облучения на циркулирующую кровь на длине волны $\lambda=632,8$ нм (He-Ne лазер) составляют совокупность следующих биофизических процессов: – фотодинамический эффект за счет прямого фотовозбуждения ППИХ, стимулирующий гемопоэз: – стимуляция диссоциации оксигемоглобина (фотодиссоциация), приводящая к повышению содержания кислорода в крови и тканях; – фотореактивация глутатионпероксидазы и миелопероксидазы – антиоксидантных ферментов, приводящая к повышению устойчивости клеточных мембран.

3. Эффекты чрезкожного облучения циркулирующей крови светом на длинах волн 600÷700 нм при дозах эквивалентных внутрисосудистому лазерному воздействию по механизмам формирования идентичны, различаясь лишь соотношением долей составляющих: фотодинамических процессов, процессов фотодиссоциации оксигемоглобина и фотореактивации антиоксидантных ферментов.

**СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕКТРОВ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ
ТВЁРДЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ПРИ ИХ ОБЛУЧЕНИИ СВЕТОВЫМИ,
РЕНТГЕНОВСКИМИ И ЭЛЕКТРОННЫМИ ПУЧКАМИ**

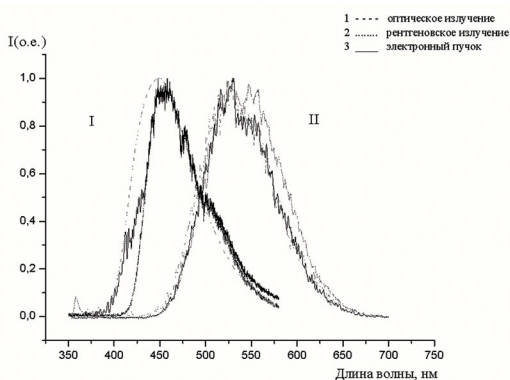
**Comparative studies of fluorescence spectra of solid drugs
when they are irradiated by light, X-ray and electron beams**

**Н.Н. БОРАЗНОВСКАЯ², Ю.Г. ЗЮЗЬКОВА², В. Е. ПРОКОПЬЕВ¹, А.В. УДУТ²,
В.В. УДУТ²**

¹Институт сильноточной электроники СО РАН, Томск, 634055, пр.Академический 2/3, РФ,

²Институт Фармакологии СО РАН, Томск, 634028, г.Томск, пр. Ленина 3, РФ

В настоящей работе проведены сравнительные исследования спектроскопических характеристик (спектры поглощения, флуоресценции и возбуждения флуоресценции) различных таблетированных лекарственных средств (ЛС) папаверин и дротаверин гидрохлориды и ацетилсалициловая кислота. Для исследования ЛС были использованы как стандартные спектроскопические приборы, так и оригинальный прибор созданный нами для экспресс-анализа ЛС.



Нормированные спектры флуоресценции таблеток папаверина (I) и дротаверина гидрохлорида (II) при возбуждении оптическим (1), рентгеновским излучением (2) и электронными пучками (3).

Специфика возбуждения рентгеновскими лучами рентгенофлуоресценции (РФ), по сравнению с фотовозбуждением, состоит в том, что на вещество воздействуют фотоны со значительно большей энергией. При этом свечение объекта вызывается

не непосредственным действием самих рентгеновских лучей, а воздействием электронов, вырывааемых из атомов и молекул вещества рентгеновскими лучами. Кроме того, свечение вещества возникает также в результате рекомбинационного процесса, когда ионизированные молекулы и атомы возвращаются в исходное основное состояние через возбуждённые квантовые уровни. Вследствие этого РФ имеет многие общие черты с катодолюминесценцией (катодофлуоресценцией (КФ)). Принципиальное различие между РФ и КФ заключается в том, что рентгеновские лучи распространяются в объёме вещества, а электронные пучки способны возбуждать излучение только на поверхности, и не проходят на глубину более 100 мкм. В результате, несмотря на один и тот же механизм возбуждения свечения вещества этими источниками, спектры флуоресценции одного и того же объекта будут различаться.

В случае фотовозбуждения, варьируя длину волны возбуждающего излучения можно исследовать как поверхностные так внутренние состояния атомов и молекул.

РАСПОЗНОВАНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ ОБРАЗОВ СЛИЗИСТОЙ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ В НОРМЕ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ Recognition of spectral images bladder mucosa in normal and in cancer

Т. А. КОВАЛИК³, В.Е. ПРОКОПЬЕВ¹, С. П. СЕЛИВАНОВ³, В. В. УДУТ²

¹Институт сильноточной электроники СО РАН, Томск, 634055,
пр. Академический 2/3, РФ,

²Институт фармакологии СО РАМН, Томск, 634028, г. Томск, пр. Ленина 3, РФ

³Лечебно – диагностический центр, Томск, 634012, пр. Кирова 58, РФ

В настоящей работе спектры флуоресценции и отражения биологических тканей анализировались с помощью стандартных методов и программ корреляционного анализа. При этом исследуемая ткань и её спектр (претендент) сравнивался с эталонными спектрами нормальных (здоровых) и малигнизированных тканей соответствующих органов. Эталонные спектры нормальной и раковой тканей получены в результате усреднения и нормировки более чем 10 образцов. Принадлежность исследуемых тканей к соответствующему классу проводили по максимальному значению коэффициенту корреляции соответствующих спектров. При идентификации спектров и соответствующих им тканей подобным образом, было установлено что, абсолютные значения коэффициентов корреляции между спектрами претендента и эталонными спектрами обычно составляют 85–91%, однако разность между значениями этих параметров в норме и патологии не превышает 3–5%, что явно не достаточно для уверенного окончательного диагноза. Выяснилось, что в этих же случаях, простое визуальное сравнение спектров позволяет гораздо точнее отнести исследуемые спектры к соответствующему классу.

Вследствие этого, необходимо было провести дополнительное уточнение классификации спектральных образов по каким либо существенным признакам. Наш подход обработки экспериментальных зависимостей интенсивности излучения от длины волны (спектральные кривые) предполагает, что эти кривые на своих крыльях касаются оси нулевого уровня сигнала (оси длин волн) и вместе с этой осью образуют геометрический сюжет или образ, подлежащий числовому описанию. Такой образ может быть промоделирован кривой второго порядка $-f(x, y)$. Для числового описания таких изображений наиболее простой системой признаков являются моменты инерции различных порядков.

Например, начальные

$$m_{\alpha\beta} = \iint f(x,y) x^\alpha y^\beta dx dy, (\alpha, \beta = 0, 1, \dots)$$

и центральные

$$\mu_{\alpha\beta} = \iint f(X,Y) (X - X_c)^\alpha (Y - Y_c)^\beta dx dy, (\alpha, \beta = 0, 1, \dots)$$

где x, y – координаты изображения, а x_c, y_c – координаты центра масс (тяжести) определяются выражением

$$x_c = m_{10} / m_{00}; y_c = m_{01} / m_{00}.$$

При использовании этих дополнительных признаков точность диагностики возрастает, что приводит к тому, что разность между нормой и патологией растёт на 5–7%.

**НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ СИСТЕМЫ СВЕЯЩЕГОСЯ
ГРИБА *NEONOTHOPANUS NAMBI***
Some properties of the luminescent system of luminous mushroom *Neonothopanus nambi*

**Константин ПУРТОВ¹, Алексей ПУЗЫРЬ¹, Светлана МЕДВЕДЕВА¹,
Эмма РОДИЧЕВА¹, Владимир БОНДАРЬ^{1,2}, Иосиф ГИТЕЛЬЗОН^{1,2}**

¹Институт биофизики СО РАН, Красноярск, Красноярский край, 660036, Россия;
E-mail: purtovk@mail.ru; Fax: +7-3912-43-34-00

²ФГОУ ВПО «Сибирский федеральный университет», Красноярск

Способностью излучать видимый свет обладают многие высшие грибы, которые обнаружены в разных регионах Земного шара [1,2]. До настоящего времени механизмы свечения высших грибов остаются малопонятными, и нет однозначного мнения о молекулярной организации их люминесцентных систем. Изучение этих аспектов имеет не только фундаментальное значение, но и практическую ценность для использования светящихся грибов как биомаркеров в целях биолюминесцентной аналитики.

Мы исследовали люминесцентную систему светящегося гриба *Neonothopanus nambi*, выявленного в тропических лесах Южного Вьетнама и первоначально описанного как вид *Omphalotus af. illudent* [3].

Экспериментально показано, что свежесобранные образцы мицелия *N. nambi* обладают способностью длительной светопродукции. Установлено, что спектр люминесценции гриба находится в видимой области с максимумом 527–535 нм. Люминесцентная система *N. nambi* является кислород зависимой. Система реагентов Фентона (Fe^{2+} и H_2O_2) и диэтилдитиокарбамат натрия (ингибитор СОД), не стимулируют светопродукцию гриба – это позволяет предпологать, что изучаемая люминесцентная система, вероятнее всего, функционирует без участия супероксид анион радикала. В то же время показано, что люминесценция мицелия *N. nambi* стимулируется добавками только перекиси водорода, что может свидетельствовать об участии пероксидазы (или нескольких пероксидаз) в механизме светопродукции данного вида гриба. Установлено, что ионы некоторых двухвалентных металлов влияют на люминесцентную систему *N. nambi*. При этом показано, что люминесценция мицелия стимулируется ионами Mn.

Механическое разрушение мицелия *N. nambi* приводит к необратимой утрате способности гриба светиться. При этом установлено, что момент дезинтеграции мицелия не сопровождается излучением света. Это свидетельствует в пользу того, что люминесцентная система гриба локализована на клеточной мембране или в других клеточных структурах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям в рамках Федеральной Целевой Программы (Государственный контракт № 02.740.11.0766).

1. Hengring P.J., *Mycologist.*, 1994, V.8, 181

2. Выдрякова Г.А., Псурицева Н.В., Белова Н.В., Пашенова Н.В., Гительзон И.И., *Микология и фитопатология*, 2009, Т.43, 369

3. Дао Т.В., *Биотехнология*, 2009, №6, 74

ЛИПОСОМАЛЬНЫЕ ФОРМЫ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ВТОРОГО ПОКОЛЕНИЯ МТГФХ: ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С БЕЛКАМИ СЫВОРОТКИ КРОВИ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Liposomal formulations of second generation photosensitizer mTHPC: physico-chemical properties, interaction with serum proteins *in vitro* and *in vivo*

**Вадим РЕШЕТОВ^{1,2}, Жули ГАРРЬЕ², Александр СТАШЕВСКИЙ³,
Лиана БЕЗДЕТНАЯ², Владимир ЗОРИН¹**

¹Белорусский государственный университет, Минск, 220030, Беларусь

E-mail: vadim.reshetov@gmail.com

²Центр исследований и автоматизации Нанси, Университет Анри Пуанкаре, Нанси, 54511, Франция

³Институт физики НАН Беларуси, Минск, 220072, Беларусь

Использование липосом в качестве систем доставки лекарственных соединений является одним из методов увеличения фотодинамической эффективности неполярных фотосенсибилизаторов. Включение сенсibilизатора в состав липосом может изменять как фармакокинетику, так и фотофизические свойства лекарственного препарата и физико-химические свойства носителей. В данной работе исследовались классические и стерически стабилизированные липосомальные формы клинически одобренного фотосенсибилизатора метатетра(гидроксифенил)хлорина (мТГФХ).

Показано, что значительные степени нагрузки липосомальных носителей пигментом приводят к агрегации части фотосенсибилизатора и изменению фотофизических характеристик мТГФХ. Различия в локализации мТГФХ в составе классических и стерически защищенных липосом обуславливают кинетику выхода пигмента из состава липосомальных форм. Процесс перераспределения мТГФХ на белки сыворотки крови существенно зависит от липосомального носителя, и носит двухфазный характер в случае стерически стабилизированных липосом. Использование метода слежения за наночастицами позволило оценить кинетику разрушения липосом в сыворотке крови человека.

С использованием дифференциальной сканирующей калориметрии показано, что включение большого количества мТГФХ в липосомы значительно снижает температуру фазового перехода липидного бислоя.

На модели хориоаллантаоидной мембраны куриного эмбриона изучено распределение сенсibilизатора в составе васкулярной системы с помощью мультифотонного конфокального микроскопа, оценена кинетика выхода мТГФХ из липосом *in vivo* по методу фотозависимого тушения флуоресценции.

Полученные результаты показывают, что не только липосомальные системы доставки оказывают влияние на свойства сенсibilизатора, но и сам сенсibilизатор влияет на характеристики перераспределения из носителей, особенно при больших степенях нагрузки.

УЧАСТИЕ ГЛУТАМАТА В РЕАКЦИЯХ НЕЙРОНОВ И ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ

Involvement of glutamate in responses of neuronal and glial cells to photodynamic damage

РУДКОВСКИЙ М.В., КОВАЛЕВА В.Д., БЕРЕЖНАЯ Е.В., УЗДЕНСКИЙ А.Б.

Южный Федеральный Университет, Ростов-на-Дону, 344090, Россия. auzd@yandex.ru

Эффект фотодинамической терапии (ФДТ), заключающийся в генерации интенсивного окислительного стресса при действии света на окрашенные клетки в присутствии кислорода, приводящего к смерти клеток, используется в онкологии, в частности, для лечения опухолей мозга. Важную роль в реакции тканей на физические воздействия играют межклеточные взаимодействия. Для исследования роли нейроглиальных взаимодействий, основанных на межклеточной глутаматной сигнализации, в фотодинамическом повреждении нейронов и окружающих их глиальных клеток рецептора растяжения речного рака. Известно, что при электрической стимуляции аксоны рака выделяют N-ацетиласпартилглутамат (NAAG), который в межклеточной среде разлагается карбоксипептидазой II на N-ацетиласпартил и глутамат. С помощью ингибиторов, агонистов и антагонистов глутаматных рецепторов мы изучали участие глутамата и его рецепторов в ФДТ-индуцированном некрозе нейронов, а также в некрозе и апоптозе глиальных клеток. В качестве фотосенсибилизатора использован аломофталочианин Фотосенс (10^{-7} М), а источника света – диодный лазер (670 нм, 0,4 Вт/см²). Для выявления некроза и апоптоза использовали двойное флуорохромирование клеток йодидом пропидия и Hoechst33342, соответственно. Фотодинамическое воздействие вызывало некроз нейронов, некроз и апоптоз глиальных клеток. Глутамат (100 мкМ) достоверно повышал уровень ФДТ-индуцированного апоптоза глиальных клеток, но не некроза нейронов и глиальных клеток. Естественный нейроглиальный медиатор у раков NAAG (100 мкМ) также усиливал ФДТ-индуцированный апоптоз глиальных клеток, но не влиял на некроз нейронов и глиии. PBDA (3 мкМ), ингибитор карбоксипептидазы II, не влиял на некроз нейронов и глиальных клеток, но существенно повышал апоптоз глиальных клеток. Это подтверждало участие NAAG в антиапоптозном действии глутамата. Агонисты ионотропных глутаматных рецепторов NMDA (1 мМ), каинат (10 мкМ), или антагонист NMDA рецепторов МК-801 (5 мкМ) не влияли на ФДТ-индуцированную смерть нейронов и глиии. Возможно, их рецепторы отсутствовали на поверхности нейронов и глиии. Антагонист метаботропных глутаматных рецепторов I типа AP-3 (10–100 мкМ) снижал ФДТ-индуцированный апоптоз, но не некроз глиальных клеток. Таким образом, глутамат или, в естественных условиях, его предшественник NAAG, оказывали ингибирующее влияние на ФДТ-индуцированный апоптоз глиальных клеток. Возможно, они являлись посредниками, с помощью которых нейроны защищают от фотоиндуцированного апоптоза глиальные клетки.

Работа поддержана грантами РФФИ № 05-04048440, 08-04-01322, 11-04-01476 и грантом Минобрнауки РФ № 2.1.1/6185.

**FRET-ПАРА НА ОСНОВЕ КРАСНЫХ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ БЕЛКОВ ДЛЯ
ДЕТЕКЦИИ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ *IN VIVO***
FRET-pair based on red fluorescent proteins for detection of enzyme activity *in vivo*

**Александр РУСАНОВ¹, Татьяна ИВАШИНА², Григорий ЛАПШИН¹,
Илья ТУРЧИН³, Леонид ВИНОКУРОВ⁴, Александр САВИЦКИЙ⁴**

¹Учреждение Российской академии наук Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071, Россия;

E-mail: alex_rusanov@inbi.ras.ru; Fax: +7-495-952-87-25

²Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, Пущино, Московская область, 142290, Россия

³Учреждение Российской Академии Наук Институт Прикладной Физики РАН, Нижний Новгород, 603950, Россия

⁴Филиал Учреждения Российской академии наук Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Московская область, 142290, Россия

Разработана модель для детекции ферментативной активности каспазы-3 *in vitro* методом флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением. Предлагаемый подход основан на применении красного флуоресцирующего белка TagRFP в качестве донора и хромопротеина KFP в качестве акцептора, в результате чего затухание флуоресценции такой конструкции происходит гораздо быстрее, чем для индивидуального донора. Эффективность переноса энергии в созданной генно-инженерной конструкции составила 51,1%.

Согласно результатам моделирования структуры субстрата в среде GROMACS, расстояние между хромофорами донора и акцептора составляет около 60Å, в то время как согласно расчетам 50% эффективности переноса энергии соответствует расстояние 45-65Å (в зависимости от фактора ориентации κ^2).

Инкубирование полученного белка слияния с каспазой-3 приводит к увеличению интенсивности флуоресценции, а также оказывает существенное влияние на время жизни флуоресценции. Затухание флуоресценции для белка слияния описывается с помощью функции двух экспонент с временами жизни $\tau_1 = 1,2$ нс и $\tau_2 = 2,4$ нс. Инкубирование белка слияния с ферментом приводит к увеличению среднего времени жизни флуоресценции. Кинетика затухания становится моноэкспоненциальной со временем жизни $\tau = 2,4$ нс, таким же, как и для индивидуального белка TagRFP. Таким образом, наблюдение за расщеплением полученного белка слияния под действием каспазы-3 возможно вести в режиме флуоресцентных измерений с временным разрешением.

Воздействие индуктора апоптоза на клетки линии Mel Kog, экспрессирующие белок слияния, также приводит к увеличению среднего времени жизни флуоресценции.

Для доказательства возможности регистрации расщепления конструкции на животных был проведён модельный эксперимент, в котором были использованы три флуоресцирующих белка с максимумами флуоресценции в красной области спектра – TagRFP, DsRed2 и полученный белок слияния TagRFP-23-KFP. Было показано, что метод флуоресцентной детекции с временным разрешением позволяет дискриминировать эти флуорофоры по времени затухания флуоресценции.

**ВЛИЯНИЕ УФ ОБЛУЧЕНИЯ НА АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА
ПРОИЗВОДНЫХ ГИДРОКСИПИРИДИНА И ПИРИДОКСИХИТОЗАНА**
The action of UV-radiation on the antioxidant properties of hydroxypyridine and
pyridoxychitosan derivatives

**Наталья САКИНА¹, Александр ЛЕВОВ², Михаил ОСТРОВСКИЙ¹,
Александр ДОНЦОВ¹**

¹ГУ «Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН», Москва, 119334, Россия;

E-mail: nsakina@mail.ru; Fax: +7-495-137-41-01

²Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, 117312, Россия

Большое практическое значение имеет поиск новых препаратов, ингибирующих свободнорадикальные процессы, развивающиеся под действием ультрафиолетового облучения, которые могут найти широкое применение в медицине. Такие препараты должны не только ингибировать свободнорадикальные реакции, но также сами должны быть относительно устойчивыми к разрушающему действию ультрафиолета. Среди известных синтетических антиоксидантов значительный интерес вызывают производные 3-гидроксипиридина, близкие по своему строению к группе витаминов В₆ и производные гидроксисаминобензотиазола и гидроксисаминимидазола. Они обладают ингибирующим действием на свободно-радикальные реакции, изменяют структурно-функциональное состояние мембран, рецепторов и мембранно-связанных ферментов [1]. Другой класс антиоксидантов интересных в этом отношении – это пиридоксин производные хитозана, в которых в молекулу полисахарида вводится фрагмент витамина В₆. Ранее мы показали, что введение в молекулы хитозанов фрагмента пиридоксина увеличивает антиоксидантную активность на порядок по сравнению с исходными полисахаридами. Это связано с появлением в молекулах полимера оксиметильных и фенольных групп, способных участвовать в свободно радикальных реакциях.

Целью настоящей работы является скрининг производных гидроксипиридина и пиридоксичитозана в отношении устойчивости их антиоксидантной активности к действию ультрафиолета. Было исследовано 25 соединений, относящихся к трем различным классам веществ, имеющих примерно одинаковую антиоксидантную активность, а именно: производные 3-гидроксипиридина, производные амино-6-гидроксисаминотиазола и производные 5-гидроксисаминимидазола, а также 5 пиридоксичитозанов со степенью замещения от 0,2 до 0,7. Были измерены спектральные и флуоресцентные характеристики препаратов, а также их антиоксидантная активность хемилуминесцентным методом до и после облучения различными дозами ультрафиолета. Обнаружено, что некоторые из изученных веществ, главным образом производные гидроксисаминотиазола и пиридоксичитозана, не теряют свою антиоксидантную активность, а некоторые даже увеличивают ее при воздействии ультрафиолета. Обсуждаются механизмы устойчивости этих соединений к действию УФ облучения.

1. Смирнов Л.Д., «Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты», 2005, изд-во «Химия», 102.

**ГИБРИДНЫЕ БЕЛКИ НА ОСНОВЕ ЛЮЦИФЕРАЗЫ СВЕТЛЯКОВ
L. MINGRELICA. ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА, ПРИМЕНЕНИЕ**
***L. mingrelica* firefly luciferase fusion proteins. Construction, properties, application**

Дарья СМЕРНОВА, Михаил КОКШАРОВ, Наталья УГАРОВА

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, 119991, Россия
E-mail: S_mir_nova@mail.ru; Tel. +7-495-939-26-52;

В настоящее время актуальной задачей является создание новых высокочувствительных и высокоспецифичных биоаналитических реагентов для определения нанокolicеств различных физиологически активных веществ и патогенных микроорганизмов. Одним из широко развиваемых путей получения таких систем является использование гибридных белков, совмещающих в себе высокую чувствительность белка-детектора с высокой селективностью белка, способного связываться с изучаемой мишенью, посредством которого происходит фиксация белка-детектора на поверхности мишени.

В качестве белка-детектора могут выступать различные люциферазы, в частности люцифераза светляков, обладающая высокой чувствительностью вследствие высокого квантового выхода биоломинесцентной реакции, низким фоновым сигналом, который определяется стабильностью субстрата и первоначальным отсутствием люциферазы в изучаемом образце, а так же простой процедурой наработки и выделения белка в необходимых количествах. В качестве селективного компонента могут быть использованы стрептавидин или биотин-связывающий домен, обладающие высокой константой связывания.

Методами генетической инженерии сконструированы четыре плазмиды, кодирующие гибридные белки люциферазы. Плазмиды, кодирующие гены гибридных белков стрептавидин – люцифераза, можно схематично представить как: *luc_4TS-sggggsa-SA-gvehhhhh* (*luc_4TS-link7-SA-his₆*), *SA-sgggs-luc_4TS-vehhhhhh* (*SA-link5-Luc_4TS-his₆*), *SA-sgggs-mgsshhhhhssglvprgshmask-luc_4TS-vehhhhhh* (*SA-link28-Luc_4TS-his₆*). Плазмиду, кодирующую ген гибридного белка люцифераза – биотин-связывающий домен, можно представить как *luc_4TS-bccp87*. Обозначения: *luc_4TS* - ген термостабильного мутанта люциферазы светляков *Luciola mingrelica* (*4TS*), *SA* – ген стрептавидина, кодирующий 119 аминокислотных остатков, *bccp87* – ген, кодирующий 87 С-концевых аминокислотных остатков биотин-связывающего домена *E. coli* (*bccp87*).

Для гибридных белков люциферазы *Luc_4TS-link7-SA-his₆*, *SA-link5-Luc_4TS-his₆*, *SA-link28-Luc_4TS-his₆* показано, что их активность составляет 15, 20, 45% соответственно от активности исходной люциферазы *4TS*, а активность гибридного белка *luc_4TS-bccp87* составляет 60% от активности *4TS*.

Показано, что при наработке гибридного белка *luc_4TS-bccp87* в клетках *E. coli* BL21(DE3) 60% целевого белка находится в биотинилированной форме. Изучены каталитические свойства, термостабильность и спектры биоломинесценции этого гибридного белка и показано, что они близки к свойствам исходной люциферазы. Показана возможность использования комплекса гибридного белка *luc_4TS-bccp87* со стрептавидином в иммуноферментном анализе для определения содержания клеток *Salmonella typhimurium* в интервале от 10⁴ до 5•10⁶ КОЕ/мл.

**МОДУЛЬНЫЕ НАНОТРАНСПОРТЕРЫ СПЕЦИФИЧНО ДОСТАВЛЯЮТ
ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ В ЯДРА РАКОВЫХ КЛЕТОК *IN VIVO* И РЕЗКО
УВЕЛИЧИВАЮТ ИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ**

**Modular nanotransporters specifically deliver photosensitizers into the nuclei
of cancer cells *in vivo* and significantly enhance their anti-tumor action**

**Александр СОБОЛЕВ^{1,2}, Андрей РОЗЕНКРАНЦ^{1,2}, Татьяна СЛАСТНИКОВА^{1,2},
Татьяна ЛУПАНОВА^{1,2}**

¹Институт биологии гена РАН, ул. Вавилова, 34/5, 119334, Москва, Россия;

²Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Россия.

E-mail: sobolev@igb.ac.ru; Факс: (499) 135-4105

Важным вызовом тем, кто создает специфические и эффективные средства лечения, служит парадоксальная ситуация: необходимость использовать поверхностные молекулярные маркеры, чтобы обеспечить клеточную специфичность лекарства, тогда как достижение максимальной эффективности требует доставки лекарства внутрь клетки, в ее определенный субклеточный компартмент, обычно – в ядро. Нами разработаны модульные нанотранспортеры (МНТ), объединяющие эти два внешне противоречивых свойства в одной химической молекуле и состоящие из: 1) интернализуемого лигандного модуля, 2) модуля с последовательностью ядерной локализации, 3) эндосомолитического модуля и 4) модуля-носителя. Противораковые лекарства (фотосенсибилизаторы, эмиттеры альфа-частиц), доставляемые МНТ, приобретают клеточную специфичность и в 20-3000 раз большую цитотоксичность [1].

В настоящей работе нами продемонстрирована высокая терапевтическая эффективность МНТ *in vivo* при доставке фотосенсибилизаторов в 3 различных экспериментальных опухоли у 3-х линий мышей: эпидермоидная карцинома человека (на иммунодефицитных мышцах Balb/c ByJCo-*nu/nu*) и две мышечные меланомы – B16-F1 и Cloudman S91, клон M3 (на мышцах C57black/6J) и DBA/2, соответственно). МНТ обладали очень низкой токсичностью и иммуногенностью в опытах на мышках. МНТ накапливались в экспериментальных опухолях мышей с высоким отношением опухоль : не-опухоль: например, отношения опухоль : мышца или опухоль : кожа равные 8:1 и 9,8:1, соответственно, наблюдали через 3 часа после внутривенного введения МНТ мышам-опухоленосителям. Накопление МНТ в опухолях происходило преимущественно в раковых – но не в окружающих их клетках, – а в раковых клетках имело, главным образом, ядерную локализацию. Фотосенсибилизаторы, доставляемые МНТ, проявили существенно большую противоопухолевую эффективность по сравнению со свободными фотосенсибилизаторами: например, терапия эпидермоидной карциномы человека хлорином e_6 , доставляемым МНТ, усиливала ингибирование роста опухоли на 96% по сравнению со свободным хлорином e_6 и обеспечивала выживание 75% животных по сравнению с 20% у свободного хлорина e_6 или 0% у нелечёного контроля.

1. Sobolev A.S. In: The Biomedical Engineering Handbook, 4th Edition. Ed. by J.D. Bronzino, D.R. Peterson. Vol. 4: *Molecular Engineering, Nanomedicine*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2011 (in press).

ВЛИЯНИЕ СВЕТОДИОДНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ КРАСНОГО ДИАПАЗОНА НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ МИТОХОНДРИЙ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

In vitro diode-emitted red light radiation effect on mitochondrial energy metabolism of human blood lymphocytes

Ольга СТОЛБОВСКАЯ, Радик ХАЙРУЛЛИН

Ульяновский государственный университет, Ульяновск, 432290, Россия;
e-mail: ov_stolbovskaya@mail.ru; fax: +7-842-232-08-10

Во многих экспериментальных и клинических исследованиях существенное внимание уделяется изучению функционального состояния клеток иммунной системы под воздействием лазерного, светодиодного и других излучений. Светодиодное излучение красного диапазона (СДИКД) обладает хорошей проникаемостью, выраженными биологическими эффектами на различные клеточные и тканевые структуры, что определяет успех его применения при коррекции функциональных нарушений и лечении патологических процессов. Несмотря на широкое применение, малоизученными остаются аспекты, связанные с изменениями энергетического метаболизма лимфоцитов под влиянием СДИКД. Для понимания сущности процессов, лежащих в основе модулирующего влияния СДИКД на неспецифическую резистентность организма, важным критерием является анализ ферментного статуса лимфоцитов крови.

Целью настоящего исследования явилось изучение активности таких внутриклеточных ферментов лимфоцитов крови человека, как сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), α -глицерофосфатдегидрогеназы (α -ГФДГ), НАДН-диафоразы (НАДН-Д) при воздействии СДИКД *in vitro*. Каплю суспензии лимфоцитов 5 мкл облучали источником СДИКД, расстояние от излучателя до объекта составляло 0,5 см, диаметр светового пятна – 1,3 см. Применяли три дозы облучения: 4,23 Дж/см², 8,46 Дж/см² и 16,92 Дж/см². Цитологический анализ ферментной активности лимфоцитов проводили по методу Нарциссова Р.П. (1998). В результате исследования было выявлено, что активность СДГ митохондрий в контрольной популяции лимфоцитов составляла 20,54±0,29 уе. (условных единиц), а при облучении красным светом лимфоцитов в дозах 4,23 Дж/см², 8,46 Дж/см², 16,92 Дж/см² наблюдалось повышение активности СДГ, соответственно до 23,28±0,30, 25,07±0,35 и 27,18±0,45 уе. (p<0,05). Активность ЛДГ в контроле составляла 21,11±0,27, после воздействия изучаемых доз облучения красным светом на клетки соответственно 23,54±0,36, 25,01±0,37 и 26,37±0,45 уе. (p<0,05). Активность α -ГФДГ митохондрий лимфоцитов в контроле составляла 10,02±0,30 уе., а после воздействия экспериментальных доз облучения красным светом на лимфоциты, соответственно 10,94±0,30, 12,16±0,35 и 13,68±0,37 уе. (p<0,05). Активность НАДН-Д лимфоцитов в контроле составляла 9,70±0,28 уе., после воздействия изучаемых доз красного света соответственно 10,87±0,29, 11,70±0,32 и 12,76±0,35 уе. (p<0,05). Индексы соотношений активности ферментов СДГ/НАДН-Д, СДГ/ α -ГФДГ α -ГФДГ/СДГ, α -ГФДГ/ЛДГ, α -ГФДГ/НАДН-Д в лимфоцитах, подвергшихся влиянию СДИКД при различных дозах, не отличались от индексов соотношения этих ферментов в контроле, что свидетельствует об отсутствии выраженных нарушений в системе энергетического метаболизма лимфоцитов. Таким образом, нами установлено, что СДИКД *in vitro* оказывает выраженный эффект на активность ферментов энергетического метаболизма лимфоцитов крови человека. Повышение активности ферментов окислительно-восстановительного цикла прямо пропорционально зависит от дозы воздействия СДИКД.

**АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ
И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ПРАКТИКЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ**
**Antimicrobial activity of photosensitizers and its practical employment
in photodynamic therapy**

Марина СТРАХОВСКАЯ, Андрей РУБИН

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биофизики, Москва, 119991, Россия;
E-mail: marstr@biophys.msu.ru; Fax: +7-095-93-911-15

В последние годы все большее внимание привлекают исследования по фотодинамической инактивации бактерий и грибов, которые имеют выраженную практическую направленность [1]. Это обусловлено ростом устойчивости патогенных микроорганизмов к традиционной химиотерапии и необходимостью разработки альтернативных способов их инактивации.

В отличие от противоопухолевой фотодинамической терапии (ФДТ), основанной преимущественно на использовании тетрапиррольных фотосенсибилизаторов (порфирины, хлорины, фталоцианины), в антимикробной ФДТ до недавнего времени основной упор делался на сравнительно низкомолекулярные красители, преимущественно, фенотиазины (метиленовый синий, толуидиновый синий). Несмотря на то, что эти красители обладают широким спектром антимикробного действия, их применение в целях ФДТ имеет ряд недостатков. В этой связи несомненный интерес представляет изучение антимикробной активности других типов фотосенсибилизаторов, в том числе на основе тетрапиррольных структур.

Связывание фотосенсибилизаторов с микробными клетками-мишенями имеет определяющее значение при фотоинактивации, опосредованной экзогенными красителями. Особенностью строения микроорганизмов является наличие у них клеточной оболочки, толщина которой равна или превышает пробег синглетного кислорода в биологической среде. Компоненты клеточных стенок (липополисахариды наружной мембраны грамотрицательных и липотейхоевые кислоты грамположительных бактерий, фосфоманнаны и полифосфаты дрожжей) несут отрицательный заряд. Это препятствует связыванию с микробными клетками липофильных или гидрофильных анионных красителей, что суживает круг фотосенсибилизаторов с потенциальной антимикробной активностью. Широким спектром антимикробного действия и наибольшей эффективностью обладают те фотосенсибилизаторы, молекулы которых несут положительно заряженные группы. Наиболее вероятным механизмом, обеспечивающим связывание катионных фотосенсибилизаторов микробными клетками, является электростатическое взаимодействие положительно заряженных заместителей в молекулах фотосенсибилизатора с отрицательно заряженными центрами связывания на клеточных стенках [2].

1. Dai T., Huang Y., Hamblin M.R., *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2009, 6(3-4): 170.

2. Страховская М.Г., Антоненко Ю.Н., Пашковская А.А., Котова Е.А., Киреев В., Жуховицкий В.Г., Кузнецова Н.А., Южакова О.А., Негримовский В.М., Рубин А.Б., *Биохимия*, 2009, 74(12), 1603.

**ПРИМЕНЕНИЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО МЕТОДА ДЛЯ ОЦЕНКИ
ДЕТОКСИЦИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ
В РАСТВОРАХ СОЛЕЙ МЕТАЛЛОВ**

**Application of bioluminescent method for evaluating of detoxification efficiency
of humic substances in the solutions of metal salts**

Анна ТАРАСОВА¹, Надежда КУДРЯШЕВА^{1,2}

¹Сибирский федеральный университет, Красноярск, 660041, Россия;

E-mail: as421@yandex.ru; Fax: +7-913-17-033-89;

²Институт биофизики СО РАН, Красноярск, Россия

Известно, что соли металлов являются распространенными поллютантами и часто присутствуют в стоках промышленных предприятий. Одним из способов снижения токсичности вредных соединений является применение гуминовых веществ (ГВ) – продуктов разложения органической массы в почве. Данная работа связана с изучением влияния ГВ на токсичность растворов неорганических поллютантов – солей металлов переменной валентности. В качестве модельных поллютантов использовали: $K_4[Fe(CN)_6]$, $Pb(CH_3COO)_2$, $CoCl_2$, $K_3[Fe(CN)_6]$, $CrCl_3$ и $Eu(NO_3)_3$. Токсичность растворов данных соединений, а также детоксикацию ГВ-ми, определяли с помощью биоломинесцентного ферментативного теста – биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза – люцифераза. Принцип использования тест-системы основан на корреляции между изменением интенсивности биоломинесценции и токсичностью среды. Тест-система характеризуется специфичностью к группе окислителей: в их присутствии кинетика биоломинесценции характеризуется периодом задержки свечения, количественно зависящем от концентрации и физико-химических характеристик окислителя [1].

В связи с тем, что феррицианид калия $K_3[Fe(CN)_6]$ устойчив в водных растворах и характеризуется одноэлектронным переходом Fe^{3+}/Fe^{2+} , на его примере были рассмотрены химические процессы, ответственные за увеличение и уменьшение токсичности редокс-активного модельного поллютанта в присутствии ГВ.

Для оценки общей токсичности растворов использовали максимальную интенсивность биоломинесценции (I^{rel}), а окислительной токсичности – времени достижения половины максимального значения биоломинесценции ($T^{0.5}$). Показано, что с ростом концентрации $K_3[Fe(CN)_6]$ в биоломинесцентной системе происходит уменьшение I^{rel} и увеличение $T^{0.5}$. Исследованы зависимости I^{rel} и $T^{0.5}$ от концентрации ГВ-в при временах инкубирования от 0 до 50 минут. Показано, что концентрации ГВ $\leq 2 \cdot 10^{-3}$ г/л и процесс инкубирования способствуют восстановлению феррицианида в растворе. Время детоксикации раствора феррицианида ГВ-ами – не более 7 минут.

Проанализированы скорости окисления НАДН в биоломинесцентной системе в присутствии и отсутствии ГВ. Показано, что ГВ могут увеличивать скорость окисления НАДН, способствуя росту окислительной токсичности раствора, и/или уменьшать конкурентоспособность данного экзогенного окислителя, вероятно, в результате комплексобразования и нейтрализации его окислительных свойств, тем самым уменьшая токсичность растворов этого соединения.

1. Kudryasheva N, Vetrova E, Kuznetsov A, Kratasyuk V, Stom D., *Ecotoxicol Environ Saf.*, 2002, 53 (2), 221

**МЕХАНИЗМЫ РЕАЛИЗАЦИИ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА,
ИНДУЦИРОВАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЕМ УФ-СВЕТА**
Mechanisms of human lymphocyte apoptosis induced by UV light

**Мария ТРУБИЦЫНА, Олеся ЛИДОХОВА, Марина НАКВАСИНА,
Валерий АРТЮХОВ**

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж, 394006, Россия;
E-mail: avg@main.vsu.ru; Fax: +7-473-2208-308

Показано, что УФ-свет может индуцировать апоптоз в клетках некоторых лимфоидных линий. Однако молекулярные механизмы этого процесса и последовательность начальных этапов развития клеточной гибели в условиях облучения изучены далеко не полностью. В связи с этим нами при помощи методов иммуноферментного анализа, люминесценции, электрофореза в агарозном геле, ДНК-комет исследованы механизмы реализации апоптоза лимфоцитов периферической крови доноров, индуцированного воздействием УФ-света (240–390 нм) в дозах 151, 1510, 3020 Дж/м².

Обнаружено повышение по отношению к контролю уровня экспрессии мембранных рецепторов апоптотических сигналов CD95 лимфоцитов, в течение 1–5 ч после УФ-облучения клеток в использованных дозах, связанное не только с демаскированием ранее скрытых молекул CD95, но и с синтезом их новых молекул через 4 и 5 часов после облучения иммуноцитов.

Выявлено повышение уровня функциональной активности каспазы-3 лимфоцитов человека по отношению к таковому для интактных образцов через 8 и 24 ч и 6 и 8 ч соответственно после облучения клеток в дозах 151 и 1510 Дж/м². УФ-модификация лимфоцитов в дозе 3020 Дж/м² индуцирует инактивацию каспазы-3.

Установлено, что после 20 ч инкубации лимфоцитов, УФ-облученных в дозах 151, 1510, 3020 Дж/м², происходит фрагментация ДНК.

Однонитевые разрывы ДНК обнаруживаются сразу после УФ-облучения лимфоцитов в дозах 1510 и 3020 Дж/м² (ДНК-кометы типа С1) и достигают максимума через 6 ч после модификации клеток (кометы типов С2 и С3). Вероятно, накопление однонитевых разрывов ДНК приводит в итоге к формированию двунитевых разрывов, являющихся сигналом к запуску пути апоптоза, осуществляющегося с участием транскрипционного фактора р53, проапоптотического белка Вах и других митохондриальных факторов апоптоза.

Предположение о возможности участия р53 в осуществлении апоптоза лимфоцитов было подтверждено нами после обнаружения (по сравнению с интактными иммуноцитами) более высокого уровня этого белка через 6 ч после облучения клеток в дозах 1510 и 3020 Дж/м².

Полученные нами результаты позволили сделать заключение о ведущей роли рецептор-опосредованного каспазного пути в реализации апоптоза лимфоцитов после воздействия УФ-света в дозах 151 и 1510 Дж/м². Постулируется возможность инициации рецептор-опосредованного каспазонезависимого и р53-зависимого путей апоптоза в условиях УФ-облучения лимфоцитов в дозе 3020 Дж/м². Нельзя исключить и роль ионов кальция в инициации апоптоза, так как обнаружено повышение внутриклеточной концентрации этого иона после УФ-облучения лимфоцитов.

БИОАНАЛИТИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ЛЮЦИФЕРАЗЫ СВЕТЛЯКОВ **Bioanalytical applications of firefly luciferase**

Наталья УГАРОВА

Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, 119992, Россия;
E-mail: nugarova@gmail.com; Fax: +7-495-939-26-60

Рассмотрены результаты работ лаборатории по разработке и внедрению биолюминесцентных тест-систем в клинической микробиологии. Принцип их действия основан на измерении свечения, которое возникает при смешении анализируемого образца с АТФ-реагентом, в состав которого входят люцифераза светляков, люциферин и все другие компоненты, необходимые для протекания реакции. Чем выше концентрация микробного АТФ в образце, тем больше в нем содержание микробных клеток и тем интенсивнее наблюдаемое свечение (биолюминесценция).

Тест-системы включают следующие компоненты.

Прибор для измерения интенсивности биолюминесценции – люминометр ЛЮМ-1 – портативный фотоэлектронный прибор для измерения в режиме счета фотонов световых сигналов, испускаемых при протекании биохимических и/или химических реакций в растворах. Высокая чувствительность и стабильность показаний, низкий фоновый сигнал, широкий динамический диапазон измерений (4 порядка) позволяют измерять концентрацию АТФ вплоть до фемтомольных концентраций.

Реагенты для проведения анализа включают АТФ-реагент на основе мутантной термостабильной люциферазы светляков и все вспомогательные компоненты.

Методики проведения анализа основаны на определении концентрации микробного АТФ биолюминесцентным методом. Примеры методик, успешно апробированных в ряде ведущих клиник г. Москвы, приведены ниже.

Определение антибиотикочувствительности в клинических образцах для выбора наиболее эффективного антибиотика для каждого пациента (6-часовой тест) представляет большой практический интерес для химиотерапии гнойно-воспалительных заболеваний. В эксперименте сравнивают интенсивность биолюминесценции (пропорциональна титру жизнеспособных микробных клеток) в аликвотах микробной суспензии, содержащих исследуемые антибиотики (проба), и без антибиотика (контроль), через 5 ч инкубирования в питательной среде и рассчитывают коэффициент подавления роста микробных клеток под действием антибиотика, $U(\%)$. При величине $U > 70\%$ антибиотик – чувствителен, а при $U < 60\%$ – нечувствителен.

Определение концентрации микробного АТФ в смывах позволяет быстро оценить чистоту и стерильность поверхностей в помещениях медицинских учреждений и возможность использования медицинского инструментария и принадлежностей без специальной обработки.

Биолюминесцентный скрининг мочи выявляет в течение 10 мин образцы с высоким содержанием микроорганизмов (выше 10^4 бактерий/мл) для детального микробиологического исследования и исключает образцы с отрицательным результатом (менее 10^3 бактерий/мл), которые могут составлять до 80% от анализируемых образцов. В итоге значительно сокращаются затраты на проведение обследований.

**СИГНАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ, ИЗМЕНЕНИЯ АДГЕЗИИ, ЦИТОСКЕЛЕТА
И КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА, ИНИЦИИРУЕМЫЕ СУБЛЕТАЛЬНЫМ
ФОТОДИНАМИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ
В КЛЕТКАХ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА**
**Intracellular signaling, changes of cell adhesion, cytoskeleton, and cell cycle initiated
in human glioblastoma cells by sub-lethal photodynamic impact**

А. УЗДЕНСКИЙ¹, А. JUZENIENE², J. MOAN²

¹Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия; E-mail: auzd@ya.ru

²Институт исследований рака, Осло, Норвегия

Мы изучали начальные стадии реакций клеток глиобластомы человека D54Mg на сублетальное фотодинамическое (ФД) воздействие 5-аминолевулиновой кислоты (ALA), являющейся предшественником протопорфирина IX, мощного эндогенного фотосенсибилизатора. Для характеристики изменений уровня сигнальных и структурных белков мы использовали протеомные микрочипы Panorama Antibody Cell Signaling Microarray (Sigma-Aldrich). Они позволяют изучить изменения экспрессии 224 клеточных белков, участвующих в сигнальной трансдукции, регуляции клеточного цикла, апоптоза, адгезии и цитоскелета. Клетки инкубировали 2 часа с 1мМ ALA в темноте, а затем облучали 1 мин синим светом (370–450нм; 0,6Вт/см²). Выживаемость клеток, составляла 95%. После ФД воздействия клетки инкубировали 0,5; 1; 2 или 5,5 часов в темноте. Затем их лизировали, опытный и контрольный образцы конъюгировали с флуорохромами Су3 и Су5 и в их смеси инкубировали один из микрочипов. Другой микрочип инкубировали с противоположно окрашенными образцами: Су5 и Су3, что обеспечивало полный самоконтроль эксперимента. Микрочипы сканировали при 532 и 635 нм (максимумы флуоресценции Су3 и Су5). Было показано, что из сигнальных белков стабильно повышались экспрессия протеинкиназы Су1 фосфорилирование белка Raf, компонента сигнального пути Ras/Raf/MEK/ERK. Возможно, активация Raf была связана с ФД-индуцированным изменением клеточной адгезии, которое приводило к фосфорилированию протеинкиназ FAK и Puck2. Снижение уровня дистрофина и калпониина через 30 мин после ФД воздействия и позднее винкулина отражало перестройки адгезионных фокальных контактов и примембранных платформ, связывающих интегрины с актиновым цитоскелетом. Также изменялась экспрессия белков, участвующих в реорганизации микротрубочек: усиливались фосфорилирование белка тау и экспрессия белка MAP1B и снижалась экспрессия белков 3'-фосфодиэстеразы 2',3'-циклических нуклеотидов (CNP) и MAP2. Кроме того, снижался уровень общих цитокератинов и особенно цитокератинов 4 и 7. ФД воздействие ингибировало пролиферацию. В первые 30 мин после него уровни циклина D1, контролирующего переход G0/G1, белка cMyc и сверхочных белков Chk1/2, контролирующих переход G2/M снижались. Через 1 час повышались уровни фактора транскрипции E2F1, стимулирующего переход G1/S и белка CDC-27, управляющего переходом G2/M. Уровень белка Bcl-X_L повышался, а каспазы 9 - снижались, что защищало клетки от апоптоза. Таким образом, сублетальное ФД воздействие вызывало в клетках глиобластомы изменения уровня ряда сигнальных белков, участвующих в изменениях адгезии, перестройках цитоскелета, регуляции клеточного цикла и апоптоза. Работа поддержана грантами РФФИ (08-04-01322 и 11-04-01476) и Минобрнауки РФ (16.740.11.0368).

**СТРАТЕГИЯ «ПОЛЕЗНОГО СОЛНЦА» ДЛЯ ЖИВЫХ СИСТЕМ:
ОТ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ К МЕХАНИЗМАМ**
Strategy of “useful sun” for living systems: from the laws to mechanisms

**ХРАМОВ Р.Н.¹, ГАПЕЕВ А.Б.², ГУДКОВ С.В.¹, ЗАХАРОВА Н.М.²,
МАНОХИН А.А.², МУРАШЕВ А.Н.³, ПАСКЕВИЧ С.И.^{1,4}, РОМАНОВА Н.А.^{2,4},
САНТАЛОВА И.М.¹, СВИРИДОВА-ЧАЙЛАХЯН Т.А.¹, СИМОНОВА Н.Б.¹,
ФАХРАНУРОВА Л.И.¹**

¹Учреждение Российской академии наук Институт теоретической экспериментальной биофизики РАН 142290, г. Пущино, Россия, E-mail: khramov@iteb.ru; Fax: +7-4967-33-05-53;

²Учреждение Российской академии наук Институт биофизики клетки РАН 142290, г. Пущино, Россия;

³Филиал Учреждения Российской академии наук Института биоорганической химии РАН им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова, 142290, г. Пущино, Россия;

⁴Пущинский государственный университет, 142290, г. Пущино, Россия;

В современной фототерапии преимущественно используются чисто аппаратные методы лечения и оздоровления (с помощью лазеров, светоизлучающих диодов (СИД) и др. искусственных источников света), в то время как всем доступный естественный солнечный свет практически не используется. Сформулирована стратегия «useful sun – полезное солнце», основанная на применении светопреобразующих фотоллюминофорсодержащих материалов, поглощающих УФ-излучение и конвертирующих его в биостимулирующий красно-оранжевый и ИК-свет, которая принципиально отличается от традиционной стратегии «safe sun – безопасное солнце», в которой используют в основном поглощающие УФ-фильтры. Облучение оранжево-красным светом в виде дополнительной люминесцентной компоненты в солнечном излучении, способно оказать значительное биостимулирующее и защитное воздействие на организм человека, животных, эмбрионов, клеток и растений. Установлено, что стратегии «полезное солнце» по сравнению со стратегией «безопасное солнце» дает следующие преимущества для организма: а) увеличивает физическую работоспособность спортсменов при стендовых испытаниях на 9 %; б) сокращает до 30% сроки заживления трофических язв, длительно незаживающих, а также ожоговых ран кожи человека, в) повышает с кумулятивным эффектом в полтора раза физическую работоспособность адаптированных к нагрузке животных, с улучшением морфо-функциональных характеристик миокарда, г) повышает в 2,8 раза число развивающихся в культуре эмбрионов мышцы *in vitro*, д) улучшает восстановление сетчатки глаза после термического лазерного ожога, е) уменьшает уровень повреждающего действия факторов гипертонии на крысах линии SHR, восстанавливая активность систем репарации ДНК, а также активизирует ее на нормотензивных животных. В наших исследованиях задача поиска биологических механизмов усложняем тем, что преобразованное солнечное излучение с помощью фотоллюминофорсодержащих полимеров имеет практически вид солнечного спектра без УФ компоненты, но с добавленной люминесцентной компонентой оранжево-красного света. В наших экспериментальных группах доля люминесцентного оранжево-красного излучения (ЛИ) составляет около 4% от всего падающего на биообъект потока модельного солнечного света в диапазоне ФАР (400–800 нм). Анализ образования активных форм кислорода в воде, показал, что ЛИ дает трехкратное увеличение перекиси водорода по сравнению с действием солнечного излучения в диапазоне 400–800 нм. Анализ возможных механизмов действия преобразованного солнечного света (ПСС) позволяет предположить, что изменение состояние форм фотоакцепторов (фитохром, цитохром с оксидаза и др.) под действием ЛИ наиболее значимо для функционального ответа живых систем. Работа поддержана грантом РФФИ №10-02-00672-а.

ЛАЗЕРНАЯ МИКРОХИРУРГИЯ РАННИХ, ДОИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Laser microsurgery of pre-implantation mammal embryos

Аветик **ШАХБАЗЯН**¹, Artashes **KARMENYAN**², Alexander **KRIVOKHARCHENKO**³,
Олег **САРКИСОВ**¹

¹Институт химической физики им. Н.Н.Семенова, РАН, Москва, ул. Косыгина 4;
E-mail: avetik@rambler.ru; Tel: +7-909-975-65-07;

²Institute of Biophotonics Engineering, National Yang-Ming University, 155 Li-Non St.
Sec. 2, 112 Taipei, Taiwan;

³Max-Delbruck Center for Molecular Medicine, Robert-Rossle-Str.10, D-13092 Berlin-
Buch, Germany

В настоящее время в связи с развитием биофотоники появилась реальная возможность разнообразного оптико-лазерного микроманипулирования. Оптико-лазерные технологии, позволяющие проводить высоко прецизионные и максимально щадящие операции на клеточном уровне, представляют собой качественную замену традиционных инвазивных приемов микроманипулирования в клеточной инженерии. Реализация таких возможностей крайне интересна для работ с ранними эмбрионами млекопитающих, особенно в целях терапевтического и репродуктивного клонирования. Все ныне используемые методы клонирования млекопитающих, весьма сложны и поэтому требуют большого опыта и высокой квалификации экспериментатора, но, даже при выполнении этих условий, все равно существенно снижают жизнеспособность.

В настоящей работе впервые использовали лазер для проведения всех операций, связанных с клонированием эмбрионов млекопитающих, в том числе по энуклеации клеток – реципиентов (ооцитов и зигот), перфорации их блестящей оболочки, переносу соматических клеток – доноров ядер к реципиентным цитопластам и последующему слиянию цитопластов с донорскими соматическими клетками. Для проведения вышеперечисленных операций использовали инвертированный микроскоп “Olympus IX71” (Japan), сопряженный с лазером “Tsunami” (Spectra Physics, USA), работающим в пикосекундном режиме с частотой повторения 80 МГц на длине волны 800 нм, средняя мощность излучения варьировалась в пределах от 0,08 до 0,8 Вт. Для перфорации блестящей оболочки, использовали полупроводниковый лазерный модуль G145PU с длиной волны 1448нм и средней мощностью до 400мВт. В работе использовали также фемтосекундный лазер Mai-Tai (длительность 100 фс, частота повторения 80 МГц, спектральный диапазон 690–1000 нм), сопряженный инвертированный микроскоп и платформа атомно-силовой зондовой микроскопии NTEGRA фирмы NT-MDT.

В результате проведенных исследований отработаны условия и выявлены оптимальные характеристики лазерного импульса, необходимые для последовательного осуществления всех операций по клонированию эмбрионов млекопитающих. При проведении экспериментов, лазер полностью заменил используемые в практике традиционные виды микроманипуляторов. Настоящая работа показывает уникальные возможности использования лазера для клеточной инженерии на ранних эмбрионах млекопитающих.

**ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ НА АГРЕГАЦИЮ МЕРОЦИАНИНА 540
И НА ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННУЮ ЭТИМ КРАСИТЕЛЕМ
ИНАКТИВАЦИЮ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* И *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
Effect of salts on merocyanine 540 aggregation and on inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* photosensitized by this dye**

**Татьяна ШМИГОЛЬ¹, Елена СЫСОЛЯТИНА², Владимир БЕХАЛО²,
Елена НАГУРСКАЯ², Светлана ЕРМОЛАЕВА², Александр ПОТАПЕНКО¹**

¹Российский государственный медицинский университет, Москва, 117997, Россия;
E-mail: tatish@hotmail.com; Fax: +7 495 336 62 52;

²ФГБУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н. Ф. Гамалеи» Минздравсоцразвития России, Москва, 123098, Россия

Мероцианин 540 (МЦ540) используется как фотосенсибилизатор для инактивации микроорганизмов [1]. В водных растворах МЦ540 может присутствовать в нескольких агрегатных состояниях. Известно, что в дистиллированной воде краситель присутствует в мономерной и димерной формах, при добавлении солей происходит формирование крупных агрегатов МЦ540, обнаруживаемых методом резонансного светорассеяния (РСР) [2]. В настоящей работе исследовано влияние агрегатного состояния 25 мкМ МЦ540 на скорость фотосенсибилизированной (546 нм) инактивации *S. aureus* и *P. aeruginosa* в дистиллированной воде и в 0,25 М растворе NaCl, где краситель в основном находился в форме крупных агрегатов. По данным РСР при использованной концентрации соли не менее 3/4 молекул красителя находятся в агрегированном состоянии. Показано, что в присутствии NaCl скорость гибели *S. aureus* возростала примерно в 28 раз, а *P. aeruginosa* – примерно в 10 раз по сравнению с дистиллированной водой. Одновременно в солевом растворе фотоокисление МЦ540 ускорялось примерно в 29 раз. Результаты показывают, что агрегация МЦ540 в присутствии соли значительно повышает эффективность фотосенсибилизированной МЦ540 инактивации для *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Также полученные данные указывают на возможность индуцированного добавлением соли переключения механизма фотосенсибилизации с фотогенерации МЦ540 синглетного кислорода [3] на свободнорадикальный [4].

1. Sbarra MS, Di Poto A., Arciola C.R., Saino E., Sharma M., Bragheri F., Cristiani I., Speziale P., Visai L., *Int J Artif Organs*, 2008, 31, 848.

2. Тихомиров А., Шмиголь Т., Кожинова Е., Кягова А., Бездетная Л., Потепенко А., *Биофизика*, 2009, 54, 824.

3. Feix JB., Kalyanaraman V., *Arch Biochem Biophys*, 1991, 291, 43.

4. Davila J., Harriman A., Gulliya KS., *Photochem Photobiol*, 1991, 53, 1.

Секция 5

БИОФОТОНИКА

**ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРАЛЬНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПОЛИМЕТИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ CYAN2
С ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ И ХОНДРОИТИН-4-СУЛЬФАТОМ**
The study of spectral and fluorescent characteristics of the interaction of the polymethine
dye Cyan 2 with hyaluronic acid and chondroitin-4-sulfate

Тимофей АКИМКИН¹, Александр ТАТИКОЛОВ¹, Сергей ЯРМОЛЮК²

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина 4,
Москва, 119334, Россия;

E-mail: aki.tim@gmail.com; Phone: +7-495-939-71-71;

²Институт молекулярной биологии и генетики Национальной академии наук
Украины, Киев, 252143, Украина

Полиметиновые красители обладают свойством изменять спектрально-флуоресцентные характеристики в зависимости от молекулярного окружения и, таким образом, являются перспективным классом красителей для поиска и разработки молекулярных зондов.

В настоящей работе спектрально-флуоресцентными методами исследовано нековалентное взаимодействие полиметинового красителя 3,3',9-триметил-тиакарбоцианина (Cyan2) в различных условиях с двумя сходными по структуре биополимерами: гиалуроновой кислотой (ГК) и хондроитин-4-сульфатом (Х4С). Несмотря на практически полную идентичность их химических структур (отличие в одну сульфогруппу), наблюдаются два разных типа взаимодействия красителя с данными биополимерами. В присутствии ГК Cyan 2 образует Н-агрегаты, что отражается в появлении коротковолновой полосы поглощения с максимумом при 440–450 нм. Для этих агрегатов определено число агрегации $n = 3$. Рост квантового выхода флуоресценции (Φ_f) при данном взаимодействии отсутствует. [1]

При взаимодействии Cyan2 с Х4С образование Н-агрегатов не наблюдается. Введение Х4С в раствор красителя приводит к существенному росту Φ_f и bathochromному сдвигу спектра поглощения красителя. Была обнаружена зависимость Φ_f Cyan2, связанного с Х4С, от pH среды. Так, при pH 4,5 и 9,0 $\Phi_f \sim 0,7$ (примерно в 350 раз больше по сравнению с чистым красителем), а при pH 7,0 $\Phi_f \sim 0,2$. С помощью математического моделирования роста Φ_f красителя в присутствии Х4С произведена оценка числа и константы связывания красителя с биополимером при различных pH среды. Основываясь на полученных результатах, мы предложили краситель Cyan 2 в качестве спектрального зонда для обнаружения ГК и спектрально-флуоресцентного зонда для обнаружения Х4С в биологических системах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Р10-03-00647а, 09-04-01054а).

1. Акимкин Т.М., Татикилов А.С., Панова И.Г., Ярмолук С.М.. *Химия высоких энергий*, 2011, в печати.

ДИАГНОСТИКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ИНАКТИВАЦИИ КЛЕТОК НА ОСНОВЕ ЛАЗЕРНОГО КОНФОКАЛЬНОГО РАМАНОВСКОГО ТОМОГРАФА

Diagnostics of cell inactivation with laser confocal Raman tomograph

Гариф **АКЧУРИН**^{1,2}, Георгий **АКЧУРИН**^{1,2}, Даниил **БРАТАШОВ**¹,
Дмитрий **ГОРИН**^{1,3}, Сергей **ПОРТНОВ**^{1,3}

¹Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Саратов, 410012, Россия;

E-mail: AkchurinGG@mail.ru; Fax: (8452)27-85-29;

²Институт точной механики и управления РАН, Саратов, 410028, Россия

³Объединенный исследовательский центр технологий и измерения наноструктур СГУ

Предложен и апробирован способ определения функциональной гибели клеток, относящийся к области биомедицинских технологий, в частности к созданию контролируемого лазерного фототермического разрушения раковых клеток, патологических клеток крови или порогового воздействия электромагнитного излучения других спектральных диапазонов, включая ультрафиолетовое, рентгеновское, гамма, СВЧ и КВЧ излучение на основе анализа изменения спектров комбинационного рассеяния биомолекул отдельной живой клетки, измеренных с помощью конфокального лазерного томографа. Лазерная конфокальная технология позволяет измерить спектр комбинационного рассеяния света от одной исследуемой клетки с помощью оптического конфокального когерентного томографа, используя зондирующее излучение с длиной волны, не попадающей в полосу поглощения хромофоров клетки. При облучении клетки резонансным лазерным излучением, попадающим в полосу поглощения хромофоров клетки и вызывающим гипертермию, увеличивают интенсивность лазерного излучения до величины, вызывающей изменение спектральных компонент комбинационного рассеяния и определяют функциональную гибель клетки по пороговому уровню лазерного воздействия, при котором возникают необратимые изменения спектральных компонент комбинационного рассеяния [1].

Апробация метода проводилась с помощью лазерного конфокального рамановского томографа INTEGRA (Зеленоград). Измерения проводились на форменных элементах цельной крови, включая эритроциты и лейкоциты. Представлены измеренные спектры комбинационного рассеяния одного выбранного эритроцита в диапазоне волновых чисел 100–4000 см⁻¹ с помощью лазерного излучения с длиной волны $\lambda=633$ нм, не попадающей в полосу поглощения гемоглобина эритроцита и после воздействия на эритроцит сфокусированного лазерного пучка с диаметром после микрона с длиной волны $\lambda=473$ нм с оптической мощностью 20 мВт в течении нескольких секунд, вызывающий сильную гипертермию, приводящую к локальной карбонизации части эритроцита, что однозначно проявляется на возникновении дополнительных спектральных компонент комбинационного рассеяния. Известно, что средний объем эритроцита человека составляет 80–95 мкм³ с содержанием гемоглобина 25–34 пг, а анализируемый конфокальный объем 0,5 мкм³.

Метод позволяет не только определить функциональную гибель клеток, но и исследовать динамику инактивации, в отличие от пороговых флуоресцентных методов повреждения плазматической мембраны клетки, связанных с диагностикой некроза.

1. Акчурин Г.Г., Акчурин Г.Г. м.л., Браташов Д.Н., Горин Д.А., Портнов С.А. Патент РФ № 2 412 442, опублик.20.02.2011, Бюл. №5.

**ИЗУЧЕНИЕ ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНОГО УЗНАВАНИЯ МЕТОДОМ
ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ**
Fluorescence correlation spectroscopy as a tool for studying ligand-receptor recognition

Юрий АНТОНЕНКО¹, Анна ЛАПАШИНА²

¹НИИ Физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва; E-mail: antonen@genebee.msu.ru; Fax: +74959393181;

²Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В.Ломоносова

Метод флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС) используется для исследования процессов, связанных с изменением подвижности молекул и комплексов, и позволяет изучать такие процессы, как агрегация частиц, связывание флуоресцирующих молекул с надмолекулярными комплексами, липидными везикулами и т.д., причем диапазон размеров изучаемых объектов очень широк: от молекул красителей до наночастиц, размер которых достигает сотен нанометров. В настоящей работе метод ФКС применен для изучения лиганд-рецепторного узнавания в модельных системах, в частности, взаимодействия водорастворимых флуоресцентно-меченных лигандов с рецепторами, локализованными на поверхности липидных везикул. В системе из флуоресцентно-меченого стрептавидина и биотинилированного липида показана существенная зависимость эффективности взаимодействия от длины спейсера между биотином и полярной головкой липида. Методом ФКС зафиксировано также электростатическое взаимодействие между флуоресцентно-меченым полилизинном и встроенными в мембраны липосом отрицательно-заряженными молекулами О-пиромеллитилграмицидина.

**ЛАЗЕРНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА РАЗВИТИЕ СТВОЛОВЫХ
И ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК**
Effect of laser illumination on the development of stem and embryo cells

В.Н. БАГРАТАШВИЛИ

Учреждение Российской Академии Наук Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Троицк, Московская область; E-mail: bagrat@laser.ru

Изучалось действие низкоинтенсивных электромагнитных излучений (ЭМИ), а также поля лазероиндуцированной гидродинамики на эмбриональное и постэмбриональное развитие биообъектов, а также на стволовые клетки стромы костного мозга. Использовались ЭМИ с неабляциянными, не повреждающими ткань параметрами, принятыми для низкоинтенсивной лазерной и КВЧ терапии. Под действием таких ЭМИ в клинических условиях достигаются мощные противовоспалительный, противоотёчный, гипокоагуляционный эффекты, ускоренная регенерация повреждённых тканей, рост коллатеральной капиллярной сети, приводящий к усиленному кровоснабжению органов, нормализация показателей иммунитета, протекторное и профилактическое действия.

Воздействие на биообъекты проводилось излучением гелий-неонового лазера (633 нм, 0,4 мВт/см²), светодиодных матриц (630, 660, 850, 890 нм) и низкоинтенсивного ультрафиолетового излучения (365 нм, 0,16 мВт/см²). Кроме этого, изучалось воздействие солнечного света, прошедшего через светопреобразующие матрицы, которые преобразовывали УФ излучение в оранжево-красную часть спектра (620–640 нм), обладающую биостимулирующим эффектом.

Один из подходов заключался в воздействии на биообъекты полем лазероиндуцированной гидродинамики. Согласно современным представлениям, поле ЛИГ, связанное с образованием и схлопыванием парогазовых пузырьков в водонасыщенной ткани вблизи торца оптического волокна, является основным терапевтическим фактором некоторых новых медицинских технологий, использующих волоконные лазеры умеренной мощности (1–5 Вт). Такое воздействие запускает процессы регенерации ткани и приводит к восстановлению поврежденного органа.

В качестве биообъектов использовались:

- стволовые клетки стромы костного мозга;
- эмбрионы аквариумной рыбки данио рерио;
- пресноводные рачки дафнии *Daphnia magna Straus*
- партеногенетические эмбрионы *Daphnia magna Straus*

Поскольку, как показали проведенные ранее исследования, результат воздействия на биообъекты значительно зависит от состояния самих биологических объектов, нами изучалось действие на биообъекты в состоянии «норма» и на «ослабленные», подвергнутые действию различных стресс-факторов окружающей среды. В качестве стресс-факторов использовались температура, пониженное питание, ультрафиолетовое излучение.

**ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ИММУНОТОКСИНА,
СПЕЦИФИЧНОГО К РЕЦЕПТОРУ HER2/neu,
НА МОДЕЛИ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩЕЙ ОПУХОЛИ**
**Studies of anti-HER2/neu immunotoxin antineoplastic activity
on fluorescent tumor model**

**Ирина БАЛАЛАЕВА¹, Евгения МАЛЕХАНОВА¹, Наталья ЛЕКАНОВА¹,
Ирина КРУТОВА¹, Анна БРИЛКИНА¹, Сергей ДЕЕВ^{1,2}**

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603950, Россия;

E-mail: irin-b@mail.ru; Tel.: +7-831-465-61-06; Fax: +7-831-465-97-58;

²Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997, Россия

Создание флуоресцирующих опухолевых моделей определило появление методов экспериментальной онкологии, основанных на прижизненной неинвазивной регистрации флуоресценции опухолевых клеток в организме животного [1]. Флуоресцентное маркирование может быть получено путем трансфекции прививаемых животному опухолевых клеток геном флуоресцентного белка. При этом исследователь получает возможность наблюдать рост и развитие первичной опухоли и метастазов, взаимодействие опухоли с тканями хозяина, ответ на действие противоопухолевой терапии.

В работе представлены результаты оценки противоопухолевой активности иммунотоксина, специфичного к онкомаркеру HER2/neu, на модели флуоресцирующей опухоли. Эксперимент проводился на бестимусных мышках-самках линии nude с подкожно привитой карциномой яичника человека, трансфицированной флуоресцентным белком Katushka (SKOV-3-kat) [2]. Протестирован противоопухолевый эффект иммунотоксина 4D5-ЕхoА, сконструированного на основе миниантитела 4D5 к рецептору HER-2/neu и псевдомонадного экзотоксина А, в сравнении со стандартным химиоагентом цисплатином, неконъюгированными миниантителами и токсином ЕхoА. Двумерные флуоресцентные изображения получали *in vivo* на установке для поверхностного флуоресцентного имиджинга (Институт прикладной физики РАН, г. Нижний Новгород).

Показана высокая информативность флуоресцентного метода в отношении оценки количества опухолевых клеток в объеме узла, позволяющая визуализировать непальпируемые опухоли и метастазы. При высокой степени согласия результатов стандартного измерения объема опухоли и интегральной интенсивности флуоресценции, последний показатель позволил выявить эффекты терапии на более ранних стадиях. Продемонстрирован выраженный противоопухолевый эффект иммунотоксина, сравнимый с действием цисплатина, при этом признаков токсического действия на организм животного использованных агентов в выбранных дозах не выявлено.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ, РФФИ и программы президиума РАН «Фундаментальные науки - медицине».

1. Hoffman R.M. Nature Reviews, 2005, 5, 796.

2. Карпенко Д.В., Стрёмовский О.А., Деев С.М. Патент РФ № 2404244.

АНАЛИЗ СПЕКТРОВ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ И ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ФОТОПРОТЕИНОВ

Spectral analysis of bioluminescence and photoluminescence of photoproteins

Надежда БЕЛОГУРОВА¹, Роза АЛИЕВА², Надежда КУДРЯШЕВА^{1,2}

¹Институт биофизики СО РАН, Красноярск, 660036, Россия;
E-mail: nbelogurova@mail.ru; тел: +7 391 2494242, факс: +7 391 2433400;

²Сибирский Федеральный университет, Красноярск, 660043, Россия

Ca²⁺-регулируемые биоломинесцентные реакции, катализируемые фотопротеинами, ответственны за свечение морских кишечнополостных. В настоящее время, наиболее изученными фотопротеинами являются акворин и обелин, выделенные соответственно из медузы *Aequorea* и гидроидного полипа *Obelia* [1]. Фотопротейн представляет собой стабильный фермент-субстратный комплекс, состоящий из апопротеина – односубъединичного полипептида и «преактивированного» кислородом субстрата, 2-гидропероксицелентеразина, прочно, но нековалентно связанного с белком. Добавление Ca²⁺ к фотопротейну вызывает биоломинесцентную реакцию, продукт которой – комплекс апопротеина с целентерамидом – принято называть разряженным фотопротейном. В отличие от фотопротеинов, разряженные фотопротеины являются флуоресцентными белками.

Спектры биоломинесценции и фотолюминесценции акворина и обелина являются широкими и ассиметричными. Очевидно, что они представляют собой суперпозицию нескольких спектров, каждый из которых можно соотнести с излучателем определенной структуры. В результате разделения спектров биоломинесценции выявлено, что в случае обелина спектр представлен четырьмя компонентами, а в случае акворина – тремя [2]. Разделение спектров фотолюминесценции показало, что испускание обелина является суперпозицией спектров четырех излучателей, а акворина – двух. В то же время, спектр возбуждения обелина представлен тремя компонентами, а акворина – одним. Положения максимумов выделенных компонентов, близки, но вклады их различны.

Установлено, что вклады компонентов фотолюминесценции разряженного обелина зависят от концентрации Ca²⁺. Изучение спектров фотолюминесценции разряженного обелина при различных концентрации Ca²⁺, выявило существование конформационного перехода в данном фотопротейне при [Ca²⁺] = 5 • 10⁻⁷ М [3].

Проведено соотнесение выделенных компонентов различным флуоресцентным формам целентерамида. Один из компонентов приписан излучению протонированной формы целентерамида. Остальные компоненты вероятно соответствуют формам целентерамида, образующимся в результате переноса протона от фенольной группы целентерамида к гистидину в активном центре фотопротеина. Таким образом, предполагается существование четырех депротонированных флуоресцентных эмиттеров, которые, различаются своей кислотностью, т.е. эффективным положением протона между фенольной группой целентерамида и акцептором протона.

1. Vysotski E.S., Lee J., *Acc. Chem. Res.*, 2004, 37 (6), 405.

2. Belogurova N.V., Kudryasheva N.S., Alieva R.R., Sizykh A.G., *J.Photochem.Photobiol.B*, 2008, 92 (2), 117.

3. Belogurova N.V., Kudryasheva N.S., *J.Photochem. Photobiol.B*, 2010, 101 (1), 103.

ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ И ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В КУЛЬТУРАХ НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Features of the accumulation and subcellular distribution of different photosensitizers in cultures of normal and cancer cells

**Анна БРИЛКИНА¹, Любовь ДУБАСОВА¹, Ирина БАЛАЛАЕВА¹,
Екатерина СЕРГЕЕВА², Алексей КАТИЧЕВ¹, Наталия ШАХОВА²**

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603950, Россия;

E-mail: annbril@mail.ru; Fax: +7-831-46-561-04;

²Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород, 603950, Россия

Особенности взаимодействия фотосенсибилизаторов (ФС) с нормальными и опухолевыми клетками, прежде всего их цитостатичность, динамику накопления и субклеточную локализацию, необходимо учитывать при создании новых эффективных препаратов для ФДТ. Цель работы заключалась в сравнительном анализе динамики накопления и внутриклеточного распределения фотосенсибилизаторов разных классов в культурах нормальных и опухолевых клеток. Фотосенсибилизаторы тестировались на культурах нормальных гепатоцитов (линия Chang Liver), аденокарциномы печени (линия SK-HEP-1), карциномы мочевого пузыря (линия T 24). Были использованы отечественные препараты на основе аминолевулиновой кислоты (5-АЛА), хлоринового (Фотодитазин) и фталоцианинового (Фотосенс, Холосенс, Фталоцианин) ряда. Суточную динамику накопления фотосенсибилизаторов исследовали на прочном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, USA). Внутриклеточную локализацию выявляли с помощью лазерной сканирующей системы Carl Zeiss Axiovert 200 M LSM 510 META.

Установлены отличия в динамике накопления экзо- и эндогенных ФС в нормальных и опухолевых клетках человека. В присутствии 5-АЛА, нормальные гепатоциты максимально накапливают эндогенный протопорфирин IX через 3 часа, а опухолевые клетки через 6, и в 1,5-3,5 раза интенсивнее. В то же время, для экзогенного ФС Фотодитазин отличия достоверны только после 12 часов инкубации, а для экзогенных фталоцианиновых ФС динамика накопления в нормальных и опухолевых клетках не различается.

Внутриклеточное распределение ФС в нормальных и опухолевых клетках одинаково, однако наблюдается зависимость локализации ФС в органеллах от химической природы исследуемых препаратов. Протопорфирин IX распределяется в клетке диффузно с максимальной плотностью в перинуклеарной области. Фотодитазин в разные периоды инкубации выявляется в мембранах: плазматической, митохондрий, аппарата Гольджи и ЭПР. Фталоцианины Фотосенс и Холосенс аккумулируются в везикулах, в то время как фталоцианин Фталосенс распределяется по мембранным структурам подобно Фотодитазину.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ, РФФИ и программы президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине».

ХИМЕРНЫЕ КАЛЬЦИЙ-РЕГУЛИРУЕМЫЕ ФОТОПРОТЕИНЫ: КОНСТРУИРОВАНИЕ И СВОЙСТВА

Chimeric calcium-regulated photoprotein: construction and properties

Людмила БУРАКОВА, Наталья МАЛИКОВА, Евгений ВЫСОЦКИЙ

ИБФ СО РАН, Красноярск, 660036, Россия;
E-mail: burakoval@mail.ru; Fax: +7-3912-43-34-00;

Ca²⁺-регулируемые фотопротеины кишечного происхождения, такие как акворин, обелин, клитин и митрокомин, несмотря на высокую степень идентичности их аминокислотных последовательностей и пространственных структур, различаются по кинетике биолюминесцентного ответа на добавление кальция, чувствительностью к ионам кальция и магния и т.д. [1]. В данной работе рассмотрены конструирование и физико-химические свойства пяти химерных фотопротеинов, состоящих из I, II-III и IV «EF-hand» мотивов (α -helix-loop- α -helix) обелина из гидроида *Obelia longissima* и митрокомина из гидромедузы *Mitrocoma cellularia* в различных комбинациях.

Показано, что химерный фотопротеин HC(I)-OL(II-IV), включающий I «EF-hand» мотив митрокомина и II-IV «EF-hand» мотивы обелина, обладает более низкой аффинностью к ионам кальция и сохраняет высокую удельную биолюминесцентную активность. Введение в HC(I)-OL(II-IV) замены фенилаланина на триптофан в позиции 119 с помощью сайт-направленного мутагенеза дополнительно снижает чувствительность химерного фотопротеина к кальцию, делая его пригодным для применения в качестве внутриклеточного индикатора в компартаментах клетки с высоким содержанием Ca²⁺ (митохондрии, ЭПР). Химерный фотопротеин HC(I)-OL(II-IV) с заменой F119W успешно экспрессирован в клетках CHO.

1. Высоцкий Е.С., Маркова С.В., Франк Л.А., *Молекулярная биология*, 2006, 40 (3), 404.

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ ГЕНЕРАЦИИ ПОТЕНЦИАЛОВ ВОЗБУЖДЕНИЯ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Fluorescent analysis of excitation potentials generation in higher plants

В.А. ВОДЕНЕЕВ¹, Л.А. ОРЛОВА¹, Е.К. АКИНЧИЦ¹, В.Н. НЕРУШ¹, В.С. СУХОВ¹,
И.В. БАЛАЛАЕВА^{1,2}

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского, Нижний Новгород, 603950, Россия; E-mail: v.vodeneev@mail.ru;

²Институт прикладной физики РАН, г. Нижний Новгород, 603950, Россия

Известно, что в ответ на внешнее воздействие высшие растения способны генерировать потенциалы возбуждения, различающиеся по типу индуцирующих факторов: при не повреждающем раздражении происходит генерация потенциала действия (ПД), напоминающего ПД у животных, при повреждающем – генерация и распространение характерного только для высших растений переменного потенциала (ВП) [1, 2]. Механизмы генерации потенциалов возбуждения у высших растений остаются до сих пор малоизученными, что в первую очередь связано с методическими трудностями – малый размер клеток, интеграция клеток в единую электропроводящую систему – симпласт [3]. Одним из путей решения данной проблемы является использование флуоресцентных зондов, позволяющих производить регистрацию изменения концентрации ионов наряду с регистрацией электрофизиологической активности [4]. Целью работы стало изучение механизма генерации потенциалов возбуждения, в частности оценка участия в данном процессе H^+ -АТФазы плазматических мембран с помощью метода флуоресцентного анализа. Объектом исследования служили 3–4 недельные проростки тыквы *Cucurbita pepo* L. Об участии в процессе формирования реакции высшего растения H^+ -АТФазы плазматических мембран судили по изменению величины внеклеточного рН. Изменения рН апопласта регистрировали с помощью флуоресцентного зонда FITC-dextran, увеличение интенсивности флуоресценции которого соответствует сдвигу рН в щелочную сторону. Регистрацию флуоресценции осуществляли на комплексе лазерной сканирующей микроскопии (микроскоп Axiovert 200M, лазерный сканирующий модуль Carl Zeiss LSM 510, спектральный модуль Carl Zeiss 23 META). Одновременно с регистрацией флуоресценции осуществляли запись электрической активности с помощью макроэлектродов. При нанесении раздражения одновременно были зарегистрированы электрическая реакция и локальное переходное увеличение интенсивности флуоресценции FITC-dextran. Переходное увеличение интенсивности флуоресценции зонда свидетельствует о временном защелачивании рН апопласта. Стоит отметить, что в случае ВП защелачивание носило более длительный характер. Результаты проведенной работы указывают на возможность непосредственного участия протонной АТФазы в генерации потенциалов возбуждения у высших растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 09-04-97085)

1. Пятыхин С.С., Оприлов В.А., Воденев В.А., *Физиология растений*, 2008, 55(2): 312
2. Fromm J., Lautner S., *Plant Cell Environ.*, 2007, 30, 249
3. Оприлов В.А., Пятыхин С.С., Ретвин В.Г. Москва: Наука, 1991
4. Fisahn J., Herde O., Willmitzer L., Pena-Cortes H., *Plant Cell Physiol*, 2004, 45, 456.

**ФОТОНИКА ГЕМОГЛОБИНА И КИНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
КООПЕРАТИВНОГО СВЯЗЫВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА**
Hemoglobin photonics and kinetic aspects of cooperative molecular oxygen binding

Б.М. ДЖАГАРОВ, С.В. ЛЕПЕШКЕВИЧ

Институт физики им. Б.И. Степанова, Минск 220072, Беларусь
E-mail: bmd@imaph.bas-net.by; Fax: +375-17-284-0879

Известно, что фотовозбуждение комплексов гемоглобина (Hb) с молекулярным кислородом (O_2) приводит к разрыву связи между гемовым железом и лигандом. Реализовав таким образом “мгновенный” разрыв связи Fe-лиганд мы получаем возможность в реальном масштабе времени изучать движение O_2 внутри белковой матрицы. В данном докладе будут представлены результаты исследований методами лазерной кинетической спектроскопии и молекулярной динамики механизма реакций ассоциации - диссоциации молекулы O_2 с Hb.

Методами лазерной кинетической спектроскопии в специально подобранных системах золь-геля впервые измерены кинетические параметры реакции оксигенации гемоглобина человека в двух основных R- и T-конформационных состояниях. Эти результаты позволили вычислить зависимость сродства гемоглобина к O_2 от конформационного состояния белка и, таким образом, следить за изменениями параметров реакции оксигенации гемоглобина по мере насыщения его кислородом.

Методом молекулярной динамики прослежены траектории движения молекулы O_2 в матрице изолированной α субъединицы гемоглобина, находящейся в водной оболочке, в первые 25 нс после диссоциации (во временном диапазоне протекания реакции повторного связывания O_2 с белком). Показано, что движение лиганда в белке происходит предпочтительно по ограниченному набору траекторий, берущих начало у атома железа гема и достигающих вторичных полостей белка (вторичных сайтов). Переходы лиганда между соседними полостями осуществляются практически мгновенно, движение лиганда ассоциируется с быстрыми “прыжками” между соседними полостями. В ходе своего движения O_2 посещает шесть ксенон-связывающих областей, названных Xe1 – Xe6 сайтами. В ряде случаев лиганд возвращается из вторичных сайтов в область гемового кармана. Обнаружено ограниченное число каналов, по которым молекула лиганда может мигрировать в растворитель. Совместный анализ данных, полученных методом лазерной кинетической спектроскопии и молекулярной динамики, позволил определить константы переходов молекулы O_2 внутри белка и оценить константу связывания лиганда с гемовым железом из области первичного внутрибелкового сайта. Установлены аминокислотные остатки, участвующие в столкновении с молекулой O_2 при ее миграции в матрице белка. Определены вероятности столкновений молекулы O_2 с определенными аминокислотами белка. Установлено, что аминокислоты Leu²⁹, Met³², Phe³³, Phe⁴³, Phe⁴⁶, His⁵⁸, Val⁶², Leu¹⁰¹, Ser¹⁰², Leu¹⁰⁵, Leu¹⁰⁹, Phe¹¹⁷ и Ser¹³³ играют существенную роль в процессе миграции O_2 внутри белка. Мутация этих аминокислот может вызвать существенное изменение O_2 -связывающих свойств α цепи гемоглобина и тетрамера гемоглобина в целом.

ГЕНЕРАЦИЯ НЕРАСХОДЯЩИХСЯ ПУЧКОВ СВЕТА ОТ ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ ЛАЗЕРОВ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ

Generation of non-diffracting beams from laser diodes for biomedical applications

В. В. ДЮДЕЛЕВ¹, С. Н. ЛОСЕВ¹, А. Г. ДЕРЯГИН¹, В. И. КУЧИНСКИЙ¹,
В. СИББЕТ², Э. У. РАФАИЛОВ³, Г. С. СОКОЛОВСКИЙ¹

¹ФТИ им. А. Ф. Иоффе, Санкт-Петербург, 194021, Политехническая, 26
Тел: (812) 292-7914, факс: (812) 297-1017, эл. почта: vlad@kuch.ioffe.ru

²University of St Andrews, North Haugh, St Andrews, KY16 9SS, UK

³University of Dundee, Nethergate, Dundee, DD1 4HN, UK

Одним из важных направлений биофотоники является оптический захват и манипулирование живыми клетками и их органеллами при помощи так называемых «оптических пинцетов». В качестве источника излучения при оптическом захвате применяются газовые и твердотельные лазеры, что делает оптические пинцеты громоздкими и дорогостоящими приборами. Принципиальным барьером на пути внедрения дешёвых и компактных полупроводниковых источников излучения в данную область является трудность фокусировки мощных полупроводниковых лазеров вследствие многомодового характера их излучения и генерации в каналах (шпотования). Мерой качества многомодового (квази-Гауссова) светового пучка принимается параметр M^2 , определяющий увеличение достижимого размера фокусного пятна по сравнению с его размером для идеального Гауссова луча. Для широкополосковых лазеров M^2 составляет 20–50, а для светодиодов превышает 200, что соответствует теоретическому пределу размера фокусного пятна, на два и более порядка превышающему дифракционный предел.

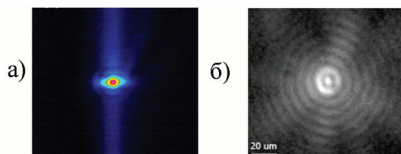


Рис. 1. Фокусировка луча полупроводникового лазера ($\lambda=1,06$ мкм, $M^2=22$) в фокусное пятно размером около 4 мкм (а) и фокусировка излучения светодиода ($\lambda=0,6$ мкм, $M^2=200$) в Бесселев пучок с диаметром центрального луча 6 мкм (б).

Для преодоления этого ограничения, нами предложена фокусировка многомодового излучения за счет использования интерференции, а не преломления света на поверхности фокусирующей оптики, применяемого для традиционной фокусировки. Ранее нами была продемонстрирована генерация пространственно-инвариантных (Бесселевых) пучков, являющихся продуктом интерференции конически сходящихся лучей [1,2], при помощи мощных полупроводниковых лазеров и светодиодов [3]. В настоящей работе экспериментально продемонстрировано фокусное пятно размером 4 мкм для полупроводникового лазера с шириной полоска 100 мкм ($\lambda=1,06$ мкм, $M^2=22$), что более чем в 2 раза меньше теоретического предела при фокусировке такого пучка идеальной оптической системой с единичной числовой апертурой. Нами также продемонстрирована фокусировка луча светодиода ($\lambda\approx 0,6$ мкм, $M^2>200$) в Бесселев пучок с диаметром центрального луча 6 мкм, что почти на порядок меньше теоретического предела, составляющего около 40 мкм. В докладе обсуждаются параметры, определяющие мощность в центральном луче и предельную длину распространения Бесселевых пучков, полученных из многомодового излучения с высоким параметром M^2 .

1. J. Durnin, J. Opt. Soc. Am., A4, 651 (1987).

2. Б.Я.Зельдович, Т.А.Пилипецкий, Изв. ВУЗов. Радиофизика, 9(1), 95 (1966).

3. Г.С.Соколовский и др., Письма в ЖТФ, 36(1), 22 (2010).

**ДИНАМИКА И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОГО
ОБРАЗОВАНИЯ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА ХЛОРИНОМ e_6 В ДМСО И В
КОМПЛЕКСЕ С ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ**

**Dynamics and efficiency of photosensitized singlet oxygen formation by chlorin e_6 in
DMSO and in complex with polyethylene glycol**

ЖАРНИКОВА Е.С., ПАРХОЦ М.В., ЛЕПЕШКЕВИЧ С.В.

Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси, Минск, 220072, Беларусь
E-mail: nicol96@list.ru, Тел. +375-29-613-69-96

Метод фотодинамической терапии широко используется для лечения онкологических заболеваний. При поверхностной локализации новообразований целесообразнее использовать фотосенсибилизаторы (ФС) в виде мази. В качестве формообразующих компонентов мази используются вазелин и полиэтиленгликоли (ПЭГ). N-метилпирролидон и диметилсульфоксид (ДМСО) добавляются как агенты, способствующие проникновению ФС через биологические мембраны.

Целью данной работы было исследование динамики и эффективности фотосенсибилизированного образования синглетного кислорода (1O_2) хлорином e_6 в ДМСО и его комплексом с ПЭГ ($M_w=1500$ Да) в буферном растворе рН 8,5.

Установлено, что в комплексе с ПЭГ время жизни триплетного состояния ФС $\tau_T = 3,5 \pm 0,2$ мкс практически совпадает со временем жизни 1O_2 $\tau_A = 3,6 \pm 0,2$ мкс. В таких условиях кинетика люминесценции 1O_2 хорошо аппроксимируется функцией вида: $I(t) = B t \exp(-k t)$, где $k = 1/\tau_T = 1/\tau_A$ [1]. Показано, что присутствие ПЭГ в буферном растворе не приводит к изменению времени жизни 1O_2 . Обнаружено также, что для комплекса хлорин e_6 – ПЭГ наблюдается увеличение амплитуды сигнала люминесценции 1O_2 , что, по нашему мнению, связано с изменением вероятности излучательного перехода $^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$.

Исследования хлорина e_6 в ДМСО показали, что кинетика люминесценции 1O_2 изменяется при увеличении энергии возбуждения. Более того, интегральная интенсивность сигнала уменьшается с ростом дозы облучения, при этом кинетика Т-Г -поглощения ФС затягивается вплоть до времени жизни $\tau_T = 300$ мкс, характерном для обескислороженных растворов. При последующем насыщении исследуемого образца кислородом воздуха кинетика принимает первоначальный вид с $\tau_T = 1,2 \pm 0,1$ мкс, τ_A при этом составляет $5,5 \pm 0,2$ мкс. Наблюдаемые изменения связаны, по-видимому, с присутствием в составе ДМСО примесей сульфидов, которые являются тушителями 1O_2 и при взаимодействии с 1O_2 окисляются до сульфоксидов [2], что, в свою очередь, приводит к уменьшению концентрации растворенного кислорода. Таким образом, использование ДМСО, содержащего указанные примеси, может снижать фотодинамический эффект ФС.

1. А.А. Krasnovsky Jг. *J.Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, 2008, 196, 210

2. Фут, К. Фотосенсибилизированное окисление и синглетный кислород. Биологические действия, В кн.: Свободные радикалы в биологии Т. 2. Под ред. У. А. Прайер. М.: Мир, 1979, 96

ГИПЕРТЕРМИЯ ОПУХОЛЕЙ С ЗОЛОТЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ ИЗЛУЧЕНИЯ

**Елена ЗАГАЙНОВА^{1,2}, Марина СИРОТКИНА^{1,2}, Вадим ЕЛАГИН^{1,2},
Марина ШИРМАНОВА¹, Марина БУГРОВА¹, Людмила СНОПОВА¹,
Анна БРИЛКИНА², Аскольд СТРИКОВСКИЙ³, Дмитрий ЯНИН³,
Екатерина СЕРГЕЕВА³, Виктор НАДТОЧЕНКО⁴**

¹ ГОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия
Нижегород, 603005, Россия;

ezagaynova@gmail.com; тел. +7-831-465-41-13; факс 7-831-465-59-04

² ГОУ ВПО Нижегородский Государственный университет им. Н.И. Лобачевского
Нижегород, 603950, Россия

³ Институт прикладной физики РАН Нижний Новгород, 603950, Россия

⁴ Институт химической физики РАН Москва, 119991, Россия

Целью работы являлась разработка методов локальной лазерной и СВЧ-гипертермии опухоли с применением плазмонно-резонансных золотых наночастиц с неинвазивным контролем накопления в опухолевой ткани. А также изучение взаимодействия золотых наночастиц с опухолевыми клетками.

Исследование выполнено на перевивной опухолевой модели мышей рак шейки матки (РШМ-5) и опухолевой клеточной линии аденокарциномы человека SCOV-3. Золотые наночастицы синтезированы в виде бипирамид и стержней. Наночастицы функционализировали полиэтиленгликолем (ПЭГ) с разной молекулярной массой. Контроль накопления наночастиц в опухоли выполняли неинвазивными методами: оптическая когерентная томография (ОКТ), оптическая диффузионная томография (ОДТ) и ближнепольное СВЧ-зондирование. Гипертермическое воздействие на опухоль проводили в период максимального содержания наночастиц в опухоли. Лазерную гипертермию выполняли в режиме 1,2 Вт в течение 20 минут. Изменение температуры на поверхности и внутри опухоли отслеживали непрерывно и неинвазивно. Для СВЧ-гипертермии применяли два режима: 50 и 150 Дж. Противоопухолевую эффективность лазерной и СВЧ-гипертермии оценивали по показателям: торможение роста опухоли (ТРО,%) и регрессия. Механизмы взаимодействия наночастиц с опухолевыми клетками изучали методами электронной и двухфотонной микроскопии. Лазерное воздействие на клеточную линию проводили в диапазоне мощностей от 0,5 до 3 Вт в течение 10 минут. Выживаемость клеток оценивали МТТ-тестом.

Таким образом, на клеточной линии получено, что способность золотых наночастиц проникать внутрь клетки зависит от вида покрытия. Использование наночастиц золота при проведении лазерной гипертермии позволяет снизить выживаемость опухолевых клеток и уменьшить мощность лазерного излучения. На опухолевой модели РШМ выявлено, что период накопления наночастиц в опухоли составляет 4–6 часов после внутривенного введения. Золотые наночастицы повышают локальность нагрева. Применение наночастиц для лазерной гипертермии приводит к быстрому нагреву опухоли (в пять раз быстрее, чем без наночастиц). Внутренняя температура опухоли с наночастицами изменяется существенно, в то время как опухоль без наночастиц внутри не нагревается. Коэффициент ТРО на 14 день после лазерной гипертермии с применением золотых наночастиц составил 64,7%.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки (ГК 02.740.11.0713, 11.G.34.31.0017), гранта РФФИ (09-02-00539).

**ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОДОРАСТВОРИМЫХ
ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ НАНОКРИСТАЛЛОВ CdSe/ZnS
И ИХ КОМПЛЕКСОВ С ХЛОРИНОМ e6**
**Photophysical properties of water soluble semiconductor nanocrystals
and their complexes with chlorin e6**

**Т. Е. ЗОРИНА¹, М. А. ЛОГАЦКАЯ¹, И. Е. КРАВЧЕНКО¹, В.А. РЕШЕТОВ¹,
М.В. АРТЕМЬЕМ², В.П. ЗОРИН¹**

¹Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Беларусь тел.+375172265947 e-mail:vpzozin@mail.ru

²НИИ ФХП Белорусского государственного университета, г. Минск, Беларусь

Конъюгация полупроводниковых нанокристаллов (НК) с традиционно используемыми в фотодинамической терапии сенсibilизаторами представляет перспективный методический подход к созданию новых фотосенсибилизирующих агентов с улучшенными фотофизическими характеристиками. Повышение активности фотосенсибилизаторов в таких комплексах обусловлено процессами переноса энергии с интенсивно поглощающих НК на классический сенсibilизатор с последующим запуском фотохимических реакций с образованием цитотоксических соединений.

Целью нашей работы являлось сравнение спектральных и фотосенсибилизирующих свойств ряда водорастворимых НК и их комплексов с хлорином e6 (Хл). В работе использовали НК CdSe/ZnS (диаметр ядра 2,6 нм), модифицированные полиэтиленгликолем, меркаптоундекановой кислотой и глутатионом.

Все исследованные НК имеют практически идентичные спектрально-люминесцентные характеристики, стабильность которых зависит от свойств среды. Связывание НК с сывороточным альбумином приводит к значительному увеличению стабильности их фотолуминесцентных свойств. Предполагается, что при молекулы белка обволакивают КТ, приводя к образованию дополнительного слоя, защищающего нанокристаллы от взаимодействия с компонентами среды и препятствующего агрегации КТ в течение длительного времени.

Результаты анализа спектральных характеристик растворов НК при титровании Хл свидетельствуют об образовании комплексов, что обеспечивает условия для переноса энергии возбуждения между нанокристаллами и порфирином. Эффективность данного процесса, выражающегося в снижении люминесценции донора (НК) и разгорании флуоресценции акцептора (Хл) зависит от типа пассивации НК.

С использованием ряда флуоресцентных индикаторов синглетного кислорода показано, что характеристики фотоактивности НК существенно зависят от полярности среды и типа гидрофильной оболочки. Связывание НК с Хл приводит к значительному ускорению сенсibilизированного окисления флуоресцентных индикаторов, при этом величина фотоактивности различных комплексов значительно превышает активность растворов чистого Хл e6, и коррелирует с интенсивностью процессов переноса энергии возбуждения.

Полученные результаты позволяют предположить, что отличия фотосенсибилизирующих свойств комплексов могут быть обусловлены как влиянием типа поверхностных лигандов на процессы связывания Хл, так и особенностями различных релаксационных процессов, влияющих на квантовый выход люминесценции НК.

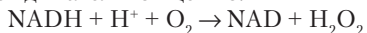
**МОРСКАЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ: БИОЛОГИЧЕСКАЯ
И БИОХИМИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ СВЕЧЕНИЯ БАКТЕРИЙ**
Sea bioluminescence: biological and biochemical functions of bacterial luminescence

ИСМАИЛОВ А.Д.

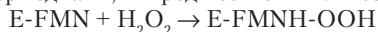
Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва 119992; anvaris@list.ru

Биологическая функция. Светящиеся бактерии — симбионты световых органов рыб и фотофоров кальмаров, комменсалы внутренних органов рыб. Способность к существованию в микроаэрофильных условиях отличительная особенность фотобактерий. В световых органах и во внутренних органах глубоководных и донных рыб бактерии генерируют свет при концентрациях кислорода менее 1%. Жизнеспособность светящихся бактерий при дефиците кислорода создает преимущества люминесцирующим организмам перед несветящимися. Хозяин способен контролировать свечение питательными веществами, кислородом или защитными нишами. Особое значение имеет регуляция эмиссии на уровне экспрессии генов автоиндуктором. Бактерии *Vibrio fischeri* из световых органов гавайского кальмара не способны к эмиссии света в культуре без автоиндуктора. Экологическая функция включает привлечение особей другого пола или своего вида. Голубое и зеленое свечение (470–500 нм) распространяется в морской среде на наибольшее расстояние, что создает преимущества в коммуникации светящимся организмам.

Биохимическая функция. Локализация световых органов и фотофоров у глубоководных рыб и кальмаров генетически детерминирована. Световые органы рыб в ходе эмбриогенеза заселяются всеми видами бактерий, но выживают только светящиеся. Гибель несветящихся бактерий связана с накоплением в органах т.н. реактивных форм кислорода. Люциферины функционируют в роли антиоксидантов. Ткани световых органов богаты супероксиддисмутазой, каталазой, активность которых резко снижается с глубиной. В глубинах океана (свыше 500 м), при дефиците кислорода, накапливаются реактивные формы кислорода: H_2O_2 , O_2^- , OH^\cdot . В световых органах концентрация H_2O_2 более чем на 2 порядка выше, чем в других тканях. Образование H_2O_2 может происходить как ферментативно, так и неферментативно, прежде всего за счет сброса электронов дыхательной цепью:



Все реактивные формы кислорода способны формировать люциферазные интермедиаты, — предшественники возбужденного состояния эмиттера.



Установлено, что ионы переменной валентности могут индуцировать распад накопившихся в бактериях перекисей с образованием молекулярного кислорода и активировать свечение бактерий. Можно полагать, что люминесцентная система осуществляет защитную функцию в клетке: 1) утилизирует возбужденные состояния ROS, возникающие в биохимических процессах; 2) обеспечивает альтернативный путь сбрасывания электронов.

**ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В КРИОГЕЛЕ ПВС КЛЕТОК ФОТОБАКТЕРИЙ**
Toxins biosensors utilizing cells of photobacteria immobilized in PVA cryogel

ИСМАЙЛОВ А.Д.¹, ЕФРЕМЕНКО Е.Н.², КУЦ В.В.¹, АЛЕНИНА К.А.¹

¹ Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва 119992; anvaris@list.ru

² Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва 119992

При использовании иммобилизованных фотобактерий в качестве биосенсоров особые требования предъявляются к длительности и стабильности свечения препаратов.

Изучены наиболее важные факторы стабилизации свечения при иммобилизации фотобактерий. Исследования основывались на предпосылке, что интенсивность и длительность эмиссии клеток в иммобилизованном состоянии комплексно контролируется: 1) длительностью и интенсивностью люминесцентного цикла выбранного штамма фотобактерий; 2) типом носителя и составом среды формирования геля; 3) процедурами иммобилизации и реактивации; 4) физико-химическими условиями хранения и применения препаратов.

Психрофильные штаммы *Photobacterium phosphoreum* отличаются наиболее высокой удельной активностью и наиболее пролонгированным свечением в процессе роста. Для получения иммобилизованных препаратов использовали психрофильный штамм 331 КМ МГУ, люминесцентный цикл которого в оптимальном режиме глубинного культивирования при 20°С превышал 100 ч. С учетом того, что свечение психрофильных бактерий крайне чувствительно к температурному воздействию, в качестве гель-формирующего агента выбран поливиниловый спирт (ПВС), процесс гелеобразования которого протекает при отрицательных температурах.

Изучено влияние среды формирования геля, процедуры криогенного гелеобразования, реактивации и хранения. Выживаемость клеток в носителе практически 100%, удельная биолюминесцентная активность восстанавливалась до уровня активности свободных клеток (~10⁵ квант/с.кл.) после 24 ч размораживания препаратов. При хранении при -80°С биолюминесцентная активность иммобилизованных клеток сохранялась без изменений в течении 2-х лет. Детектируемый уровень эмиссии в процессе инкубации иммобилизованных препаратов в оптимизированной среде при 4°С — до 1 месяца, при инкубации при 20°С — 3 суток.

Иммобилизованные клетки характеризуются более пролонгированным свечением, чем свободные клетки. Затухание свечения не является следствием гибели клеток, или истощением эндогенных субстратов, а отражает снижение восстановительного потенциала клетки. Высокая стабильность свечения служит основой применения иммобилизованных в криогеле ПВС фотобактерий в биомониторинге токсинов в режиме реального времени. Оптимизированы физические и геометрические параметры биосенсора для дискретного и непрерывного биомониторинга экотоксикантов с минимальными ограничениями для диффузии токсинов. Длительность применения индивидуального препарата в режиме протока при 15°С — 1 сутки. Чувствительность ПВС-иммобилизованных клеток к тяжелым металлов, хлорфенолам и пестицидам близка к чувствительности свободных клеток.

**ПОЛУЧЕНИЕ БИОСОВМЕСТИМЫХ СВЕТОИЗЛУЧАЮЩИХ НАНОЧАСТИЦ,
ДОПИРОВАННЫХ НОВЫМ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ ПОРФИРАЗИНОВЫМ
МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОМ, ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ**

**Preparation of biocompatible light-emitting nanoparticles doped
with novel luminescent porphyrazine metal complex for biomedical applications**

**Лариса КЛАПШИНА¹, Илья ГРИГОРЬЕВ¹, Елена ЛАДИЛИНА¹,
Марина ШИРМАНОВА², Наталья ЛЕКАНОВА³, Светлана ЛЕРМОНТОВА¹,
Ирина БАЛАЛАЕВА³, Сергей МЫСЯГИН³, Елена ЗАГАЙНОВА²**

¹ Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН

² Нижегородская государственная медицинская академия

³ Нижегородский государственный национальный исследовательский университет
им. Н.И.Лобачевского

В настоящей работе представлены методы получения и результаты предварительного тестирования биосовместимых наноразмерных форм нового порфиразинового красителя, тетрафенилтетрацианопорфиразината иттербия (III), как потенциального фотосенсибилизатора для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии опухолей. При этом для получения наночастиц были использованы 2 основные стратегии: 1) применение известных водорастворимых нетоксичных биосовместимых полимеров, таких как полиэтиленгликоль и/или метилцеллюлоза в качестве наноразмерной «капсулы», несущей в себе светоизлучающий компонент; 2) модификация светоизлучающих биосовместимых полимерных наночастиц гидрофобным гибридным компонентом, защищающим люминесцентный комплекс от воздействия воды.

Нами впервые разработан метод одностадийного приготовления стабильной светоизлучающей суспензии, содержащей монодисперсные гибридные наночастицы, модифицированные кремнийоксидным нанослоем, допированным люминесцентным металлокомплексом. Показано, что полученные наночастицы характеризуются интенсивным поглощением и флуоресценцией в области оптического «окна прозрачности» биотканей. Максимум поглощения водорастворимых наносуспензий лежит на длине волны 590 нм, максимум флуоресценции – 640 нм. Кроме того, наблюдается широкая полоса эмиссии в ближней ИК области при 950 нм, которая может быть отнесена к электронному переходу порфиразинового макроцикла из триплетного состояния в основное. Способность красителя переходить в триплетное состояние является, как известно, необходимым условием для генерирования активных форм кислорода, главного эффектора фотодинамической терапии. Отмечено гигантское усиление (более чем на 2 порядка) флуоресценции комплекса в биологических жидкостях (сыворотке крови и растворе альбумина), свидетельствующее об образовании устойчивых конъюгатов наночастиц с биомолекулами. Выявлено, что наночастицы быстро накапливаются в опухолевых клетках в культуре *in vitro* и концентрируются вокруг ядра, локализуясь, предположительно, в лизосомах.

**ФОТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИК АБСОРБЦИОННЫХ ПОЛОС
МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА В ВОДНЫХ СИСТЕМАХ**
**Photochemical analysis of the IR absorption bands of molecular oxygen
in aqueous systems**

А.А. КРАСНОВСКИЙ, А.С. КОЗЛОВ, Я.В. РУМБАЛЬ

Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской Академии наук (ИНБИ РАН); Ленинский просп., д. 33, корп. 2, Москва, 119071, Россия;
E-mail: phoal@mail.ru; anton4ikk_06@mail.ru

Интенсивность ИК полос поглощения молекулярного кислорода, соответствующих электронным переходам из основного триплетного в возбужденные синглетные состояния, очень низка, поэтому в естественных условиях, т.е. у кислорода, растворенного в органических растворителях и водных средах при нормальном давлении и температуре, абсорбционные полосы кислорода невозможно измерить прямыми спектрофотометрическими методами. Тем не менее, информация о параметрах этих полос представляет большой интерес в связи со многими вопросами фотобиохимии, фотобиологии и фотомедицины. В течение последних лет в нашей лаборатории разработаны фотохимические методы анализа ИК полос кислорода в нормальных условиях. В основе этих методов лежит прямое возбуждение растворенного кислорода ИК диодными лазерами с последующей регистрацией образовавшегося синглетного кислорода с помощью химических ловушек, в качестве которых применялись тетрацен и 1,3-дифенилизобензофуран (ДФИБФ). Применение этих методов позволило измерить положение максимумов двух главных полос (765 и 1273 нм) кислорода в органических средах, а также их полуширину и молярные коэффициенты поглощения (см. ссылки в работах [1,2]). Тот же подход оказался эффективным при исследовании кислорода в спиртовых и водных растворах при применении в качестве ловушки гидрофобного соединения – ДФИБФ [1,2]. Однако при кинетическом анализе этих систем возникли проблемы, которые привели к неопределенности в расчете молярных коэффициентов поглощения кислорода [2]. В настоящей работе мы сообщаем о разработке нового фотохимического подхода, состоящего в сравнительном анализе скоростей фотоокисления гидрофобного ДФИБФ и гидрофильной мочевины при прямом и фотосенсибилизированном порфирином возбуждении кислорода, с помощью которого получены надежные значения молярных коэффициентов поглощения в спиртовых и водных системах [3].

Работа поддержана грантом Российской Академии Наук “Фундаментальные науки – медицине” и Российским фондом фундаментальных исследований, грант 10-03-00750а.

1. A. Krasnovsky, Y. Roubal, A. Strizhakov. *Chem. Phys. Lett.* 458, 195-199, 2008
2. A. Krasnovsky, J. *Photochem. Photobiol.*, 196, 210-219, 2008
3. A. Krasnovsky, Y. Roubal, A. Kozlov, *Chem. Phys. Lett.*, submitted

**ИНДУКЦИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН
ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ**
Induction of selective permeability of lipid membranes upon photodynamic treatment

Елена **КОТОВА**¹, Алексей **КУЗЕВАНОВ**², Юрий **АНТОНЕНКО**¹

¹НИИ Физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва; E-mail: kotova@genebee.msu.ru; Fax: +74959393181;

²Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В.Ломоносова

С целью выяснения механизмов фотодинамической модификации биологических мембран проведено исследование фотосенсибилизированной индукции проницаемости модельных бислоевых мембран: липидных везикул (липосом) и плоских липидных бислоев (БЛМ). Повреждение липосом при фотодинамическом воздействии изучали по увеличению флуоресценции нагруженных ими красителей в результате снятия концентрационного тушения при высвобождении красителей из липосом в раствор. Освещение липосом красным светом в присутствии фотосенсибилизатора, трижды сульфированного фталоцианина алюминия ($AlPcS_3$), приводило к значительному выходу из липосом карбоксифлуоресцеина, слабому вытеканию сульфородамина Б и пренебрежимо малому выходу кальцеина. Тот же ряд селективности вытекания флуоресцентных красителей был получен и при использовании в качестве фотосенсибилизатора хлорина е6, который оказался более эффективен, чем $AlPcS_3$. Наряду с индукцией вытекания красителей из липосом, фотодинамическое воздействие приводило к существенной стимуляции флип-флопа липидов с внешнего монослоя на внутренний, причем оба процесса наблюдались только в мембранах, содержащих ненасыщенные липиды, и предотвращались тушителем синглетного кислорода азидом натрия. Эти данные позволили заключить, что и фотосенсибилизированная пермеабилзация мембран липосом для флуоресцентных маркеров, и облегчение трансмембранной диффузии липидов при фотодинамическом воздействии обусловлены окислением двойных связей липидов синглетным кислородом. Исходя из представлений об образовании гидрофильных пор в мембране при различных воздействиях, например, под влиянием мембрано-активных пептидов, можно было ожидать, что фотодинамическое воздействие также приведет к индукции ионной проницаемости мембраны. Однако, кондуктометрические измерения показали, что освещение липосом в присутствии как $AlPcS_3$, так и хлорина е6, не вызывало стимуляции выхода из везикул хлорида калия. Более того, освещение плоской БЛМ в присутствии фотосенсибилизатора приводило к значительному росту проницаемости мембраны для амфифильной 2-*n*-октилмалоновой кислоты, но не сопровождалось изменением проницаемости для аммония. На основе полученных результатов выдвинута гипотеза о фотодинамической индукции “пре-пор” – мембранных дефектов, проницаемых для амфифильных соединений, но не облегчающих проникновение через мембрану гидрофильных веществ.

ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГОЛОГРАФИЧЕСКИХ СЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ СЕРЕБРЯНЫХ ЭМУЛЬСИЙ

Optical properties of holographic sensors utilizing silver emulsions

А.В. КРАЙСКИЙ¹, В.А. ПОСТНИКОВ², Т.Т. СУЛТАНОВ¹, Т.В. МИРОНОВА¹,
А.А. КРАЙСКИЙ¹, М.А. ШЕВЧЕНКО¹

¹ Физический институт им. П.Н.Лебедева РАН, Москва, kraisk@sci.lebedev.ru

² ФГУ «НИИ физико-химической медицины», ФМБА России, Москва.

Голографические сенсоры (ГС) на основе серебряных эмульсий, предназначены для анализа компонентов растворов. ГС представляются перспективными, вследствие их достаточно высокой чувствительности, простоты обращения, высокой точности, широкого спектра возможных применений и экономичности. Известны их возможности для определения концентрации протонов (кислотности раствора), ионов тяжелых металлов, глюкозы в крови и других биологических жидкостях, наличие спор бактерий. Разработаны также ГС для определения концентрации летучих углеводородов в воздухе.

ГС представляют матрицу на основе полимерного гидрогеля, в которую внедрены наноразмерные твердотельные зерна, среднее расстояние между которыми много меньше длины волны видимого света так, что концентрация их периодически изменяется по пространству, образуя слоистую структуру. Слои почти параллельны поверхности подложки. То. голографический слой имеет структуру одномерного фотонного кристалла (ФК). Такая структура при освещении белым светом отражает узкополосное излучение. Специальные вещества, встроенные в матрицу, под действием тестируемого компонента раствора (ТК) вызывают изменение набухания гидрогеля. Это приводит к изменению периода структуры и к изменению длины волны отраженного излучения. То. по изменению длины волны с помощью спектрального прибора, или даже визуально, можно судить о концентрации ТК. ГС представляют интересный объект для исследования светорассеяния ансамблем наночастиц, поскольку мы можем изменять окружение этих частиц, практически сохраняя их взаимное расположение. Одним из способов формирования таких слоев является фотографический, когда образуются слои с различной концентрацией нанозерен серебра или его соединений. В таких системах на основе зерен металлического серебра мы обнаружили сильное изменение коэффициента отражения при изменении кислотности раствора. Одна из важных причин исследования оптических свойств таких материалов – необходимость обеспечить правильные условия работы сенсора. Для этого, в частности, надо обеспечить режим работы тонкого ФК во всем диапазоне рабочих концентраций тестируемого вещества. На работу голограммы сильное влияние оказывают ее светорассеивающие свойства. Они, в свою очередь, зависят от типа рассеивающего центра (металл или диэлектрик) и его свойств, а также от его окружения (ионы раствора и окружающие элементы матрицы). Светорассеяние может существенно ограничивать рабочий диапазон с коротковолновой стороны. Другим важным аспектом является проверка качества голографического слоя, в частности, его однородности. Для проверки однородности голографических свойств был разработан колориметрический способ определения длины волны с помощью цифрового фотоаппарата. С другой стороны можно проверять однородность эмульсии по распределению светорассеивающих параметров, определяемых из спектральных характеристик.

Работа поддержана грантом в рамках программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Фундаментальные науки – медицине”.

СРАВНЕНИЕ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ СИНГЛЕТНОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА В СВЯЗИ С ПРОБЛЕМАМИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ И ЛАЗЕРНОЙ ТЕРАПИИ

Comparison of analytical methods for singlet oxygen detection
in connection with the problems of photodynamic and laser therapy

А.А. КРАСНОВСКИЙ¹, А.С. КОЗЛОВ¹, О.Б. ЛЮБИЦКИЙ², А.Н. ОСИПОВ²

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской Академии наук (ИНБИ РАН), Москва, 119071, Россия; E-mail: phoal@mail.ru; anton4ikk_06@mail.ru

²ГОУ ВПО Российский государственный медицинский университет Росздрава, Москва, 117997, Россия.

Известно, что фотодинамическая терапия рака определяется синглетным кислородом (СК) и свободными радикалами, которые генерируются главным образом триплетными молекулами красителей, возникающими при поглощении красителями световой энергии. Наиболее удобным методом скрининга фотосенсибилизирующей активности красителей служит определение квантового выхода фотосенсиблированного образования СК, поскольку этот процесс прямо указывает на фотохимическую активность триплетных состояний красителей, которая определяется сочетанием трех факторов – временем жизни, квантовым выходом и эффективностью взаимодействия триплетных состояний с кислородом. Наиболее надежным методом изучения СК служит измерение фотосенсиблированной красителями собственной инфракрасной (1270 нм) фосфоресценции СК, возникающей при возбуждении красителей в аэробных системах. Однако этот метод требует применения дорогостоящего оборудования, поэтому во многих случаях полезно применение значительно менее дорогостоящих химических ловушек СК. Задача настоящей работы состояла в анализе сравнительной эффективности и информативности методов, основных на измерении фосфоресценции СК и окислении СК химических ловушек в водных системах, содержащих порфириновые фотосенсибилизаторы. Фосфоресценцию измеряли с помощью собранного в лаборатории наносекундного лазерного импульсного спектрометра повышенной чувствительности. Исследования также часто применяемые химические ловушки, которые пригодны для применения в водных средах – 1,3-дифенилизобензофуран (ДФИБФ), мочевиная кислота (МК), имидазол в сочетании с п-нитрозо-N,N-диметиланилином (так называемый метод RNO) и парамагнитная ловушка – темпидон. Об образовании СК при использовании ДФИБФ, МК и RNO судили по падению оптической плотности ловушек. В случае темпидона при реакции с СК образуется стабильный радикал ТЕМПО. Образование этого радикала определяли с помощью ЭПР спектрометра. С целью анализа реальных возможностей этих методов мы оценили их относительную чувствительность к СК. Установлено, что самым чувствительным является метод, основанный на применении ДФИБФ. Относительная чувствительность методов соответствует следующему ряду: ДФИБФ (1), МК (0,4), RNO (0,04), темпидон (0,01), фосфоресценция (0,002). Хотя фосфоресцентный метод имеет меньшую чувствительность, он наиболее информативен, так как характеризует не только факт появления СК, но также и кинетику расщепления СК и кинетику его генерации триплетными молекулами. Химические ловушки не информативны в отношении кинетических параметров СК, но из-за более высокой чувствительности позволяют применять для анализа более низкие дозы оптического излучения. Кроме того, из-за избирательного сродства к гидрофобным или гидрофильным структурам, химические ловушки дают возможность анализировать СК в различных компартментах гетерогенных систем. Наилучшие результаты дает параллельное применение метода ловушек и фосфоресцентного метода. Изложенные выводы иллюстрируются результатами анализа фотосенсибилизирующей активности производных хлорина е6 и гематопорфирина в водных и водно-детергентных системах. Работа поддержана грантом Российской Академии Наук “Фундаментальные науки – медицине” и Российским фондом фундаментальных исследований (РФФИ), грант 10-03-00-750а.

ЭФФЕКТ ТЯЖЕЛОГО АТОМА В БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ РЕАКЦИЯХ Effect of heavy atom in bioluminescent reactions

Надежда **КУДРЯШЕВА**^{1,2}, Тамара **КИРИЛЛОВА**¹, Елена **НЕМЦЕВА**^{1,2},
Марина **ГЕРАСИМОВА**²

¹Институт биофизики СО РАН, Красноярск, 660036, Россия;

E-mail: n_qdr@yahoo.com; Fax: +7-391-243-34-00;

²Сибирский федеральный университет, Красноярск, 660041, Россия

На примере биолюминесцентных (БЛ) реакций трех организмов – морских бактерий, морского кишечного и светляков продемонстрирована зависимость эффективности тушения БЛ-ии от массы галоида в составе молекулы экзогенного тушителя. Тем самым продемонстрирован «эффект внешнего тяжелого атома» в БЛ реакциях. Используются БЛ реакции, катализируемые следующими ферментами: *Photobacterium leiognathi*, *Luciola mingrelica* и фотопротейн обелин из *Obelia longissima*. В качестве экзогенных тушителей использованы ряды галогенидов калия (КСl, КBr и KI) и ксантоновых красителей (флуоресцеин, эозин и эритрозин). Константы тушения БЛ-ии рассчитаны в соответствии с теорией Штерна-Фольмера.

С использованием ряда галогенидов калия изучены вклады двух механизмов в тушение БЛ-ии: (1) физического механизма, связанного с изменением скоростей внутримолекулярной миграции энергии возбуждения между электронно-возбужденными состояниями эмиттеров БЛ-ии, и (2) биохимического механизма, связанного с взаимодействием с ферментами, т.е. «темнового эффекта тяжелого атома». На основе сравнения констант тушения фотолюминесценции модельных эмиттеров в водных растворах и констант тушения БЛ-ии показано, что второй механизм является определяющим [1].

Исследовано связывание ряда ксантоновых красителей с ферментами БЛ реакций [2]. Используются методы флуоресцентной спектроскопии со стационарным и импульсным возбуждением и временным разрешением. Продемонстрированы зависимости анизотропии, среднего времени жизни флуоресценции и количества экспоненциальных компонент в спаде флуоресценции красителей, связанных с ферментами, от атомного веса галогена в составе красителей. Первичные зависимости определяются связыванием красителей с ферментами и являются иллюстрацией «темнового эффекта тяжелого атома». Продемонстрированы корреляции между атомным весом галоидов и гидрофобностью красителей и ферментов. Предполагается, что гидрофобные взаимодействия ответственны за «темновой эффект тяжелого атома».

Исследованы процессы миграции энергии в БЛ реакциях и изменения спектров БЛ-ии в присутствии ксантоновых красителей.

Показано, что бактериальная БЛ-ия наиболее чувствительна к тяжелым галоидам.

Полученные результаты могут служить основой для разработки БЛ методов мониторинга токсичности галогенидов.

1. Kirillova T., Kudryasheva N., *Anal. & Bioanal. Chem.*, 2007, 387 (6), 2009

2. Kirillova T., Gerasimova M., Nemtseva E., Kudryasheva N., *Anal. & Bioanal. Chem.* 2011, 400 (2), 343

**ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМИ МЕТОДАМИ
НА МЕЛКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ**

**Я.Ф. ЛОГИНОВА (САЛЫКИНА)¹, В.В. ЖЕРДЕВА¹, М.В. ШИРМАНОВА²,
Е.В. ЗАГАЙНОВА², А.П. САВИЦКИЙ¹**

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, Ленинский пр-т, д.33, стр.2, 119071, Россия; salykina@inbi.ras.ru; тел. (495) 648-09-40 доб.194

²Нижегородская государственная медицинская академия, Н.Новгород, Россия

Полупроводниковые квантовые точки (КТ) типа ядро/оболочка CdSe/ZnS активно применяются для детекции опухолевых клеток, маркирования внутриклеточных органелл, визуализации микрососудов и других биомедицинских исследований [1]. Однако при всех многообещающих перспективах взаимодействия КТ с живым организмом является малоизученной областью. Потенциальная токсичность наночастиц *in vivo* напрямую связана с их фармакокинетическими свойствами (адсорбцией, распределением по органам и тканям, метаболизмом в живых организмах, экскрецией). Понимание этих процессов может дать ответы на многие вопросы, в том числе целесообразности применения КТ для терапии и диагностики.

В настоящей работе проводилась первичная оценка фармакокинетики квантовых точек (КТ) на основе селенида кадмия с разной модификацией поверхности при их внутривенном введении мышам линий nude и CD1. Были исследованы два типа водорастворимых CdSeCdS₂ZnS КТ: 1) с покрытием на основе 3-меркаптопропионовой кислоты (КТ МРА, d ~ 8–11 нм); 2) с комбинационной полимерной и кремнийорганической оболочкой (КТ PolyT-APS, d ~ 33–36 нм). О накоплении КТ в тканях, а также в моче и экскрементах судили по их специфической флуоресценции, которую регистрировали флуоресцентными методами. Флуоресценцию биотканей регистрировали в виде флуоресцентного изображения (fluorescence imaging), либо – в виде спектров, измеряемых локально, в точке ткани, при контакте с волоконно-оптическим зондом, передающим возбуждающее и флуоресцентное излучение. Для обнаружения следовой флуоресценции исследуемых наночастиц на отдаленных сроках после введения использовали метод конфокальной флуоресцентной микроскопии, обладающий более высокой чувствительностью.

Максимальная аккумуляция двух типов КТ в органах и тканях наблюдалась в первые часы после введения. Определены основные органы-мишени: КТ МРА преимущественно накапливались в легких, PolyT-APS – в печени. Методом конфокальной микроскопии показано, что КТ длительно сохранялись в организме мышей в виде скоплений в легочной ткани, а также в органах ретикуло-эндотелиальной системы. При этом флуоресцентными методами не обнаруживалось выведение КТ с мочой или экскрементами.

Данная работа выполнялась в рамках госконтрактов № 01.648.11.3003 и № 01.648.11.3006 Федерального Агентства по науке и инновациям. Работа частично финансировалась по гранту РФФИ № 09-04-12263.

1. Jamieson T., Bakhshi R., Petrova D., Pockock R., Imani M., Seifalian AM., *Biomaterial*, 2007; 28(31), 4717

**ФУРОДИГИДРОХИНОЛИНЫ – НОВЫЙ КЛАСС ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ
ДЛЯ ФОТОДЕРМАТОЛОГИИ. ФОТОХИМИЧЕСКИЕ, ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ,
АНТИОКСИДАНТНЫЕ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА**

**Furodihydroquinolines – a novel class of photosensitizers for photodermatology.
Photochemical, photophysical, antioxidation, and cytotoxic properties**

**Ольга ЛЫГО¹, Лидия МАЗАЛЕЦКАЯ¹, Евгений ХОДОТ², Владимир ВОЛНУХИН¹,
Татьяна НЕКИПЕЛОВА¹, Владимир КУЗЬМИН¹**

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 119334, Россия;
E-mail: lygo@sky.chph.ras.ru; Fax: +7-499-137-4101

²Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, 119991, Россия

Фототерапия, основанная на сочетанном использовании фотосенсибилизаторов группы псораленов и длинноволнового ультрафиолетового излучения в диапазоне 320–400 нм, является одним из современных высокоэффективных методов лечения хронических заболеваний кожи. Терапевтический эффект при лечении этим методом обусловлен образованием аддуктов циклоприсоединения триплетных состояний псораленов к тиминовым основаниям ДНК. С целью избежать серьезных побочных эффектов, которые наблюдаются при использовании псораленов, был разработан протокол синтеза различных фуродигидро- и фуротетрагидрохинолинов (ФГХ) с использованием доступных исходных соединений и наработаны следующие соединения: 7,7,9-триметил-6,7-дигидро[3,2-*f*]хинолин (**1**), N-(6,8,8-триметил-8,9-дигидрофуро[3,2-*h*]хинолин-5-ил)ацетамид (**2**), 7,7,9-триметил-4-нитро-6,7-дигидрофуро[3,2-*f*]хинолин (**3**), 4,6,6-триметил-6,7-дигидробензо[*h*]фуро[3,2-*f*]хинолин (**4**), 7,7,9-триметил-6,7,8,9-тетрагидрофуро[3,2-*f*]хинолина (**5**) и 6,8,8-триметил-6,7,8,9-тетрагидрофуро[3,2-*h*]хинолина (**6**). Показано, что синтезированные соединения **1–5** являются эффективными антиоксидантами с константами скорости взаимодействия с перекисными радикалами от 10^5 до 2×10^4 л моль⁻¹с⁻¹. Соединение **6** обладает низкой антиоксидантной активностью из-за образования водородной связи между атомом водорода аминной группы гетероцикла и атомом кислорода фуранового кольца. Исследование фотофизических и фотохимических свойств синтезированных ФГХ показало высокий выход триплетных состояний при фотовозбуждении длинноволновой полосы поглощения для соединений **1** и **2**. Количественно охарактеризованы реакции тушения триплетного состояния кислородом, тиминовыми основаниями, а также триплет-триплетного переноса энергии на краситель. Выделены фотоаддукты ФГХ **1** и **2** с тиминовыми основаниями и синтетическим олигонуклеотидом. Исследование на токсичность проводили на клетках линии рака толстой кишки НСТ116. Соединения **1–6** практически нетоксичны. При одновременном действии ФГХ и света с $\lambda = 365$ нм обнаружена гибель клеток по механизму апоптоза для соединения **2**. Установлена связь между фотофизическими и фотохимическими свойствами ФГХ и их фототоксическим действием.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН “Фундаментальные науки – медицине. 3. Биопhotоника” и Программы ОХНМ РАН № 9.

КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ПОРФИРИНОВЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ С ВОДОРАСТВОРИМЫМИ ПОЛИМЕРАМИ КАК СПОСОБ УВЕЛИЧЕНИЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Formation of porphyrin photosensitizers complexes with water-soluble polymers as a tool for enhancement of photodynamic activity

Николай МЕЛИК-НУБАРОВ¹, Тимур ЖИЕНТАЕВ¹, Умед БОЛТАЕВ¹,
Анна СОЛОВЬЕВА², Андрей ИВАНОВ³, Николай ГЛАГОЛЕВ³, Надежда АКСЕНОВА²

¹Химический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия
E-mail: melik.nubarov@genebee.msu.ru

²Институт Химической Физики им. Н.Н. Семенова Российской Академии Наук

³Российский Онкологический Научный центр им. Н.Н. Блохина Российской Академии медицинских наук.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является относительно молодым методом лечения поверхностных и полостных опухолей и раневых инфекций. Успех ФДТ во многом зависит от фотофизических и фотохимических характеристик используемого фотоактивного лекарства (фотосенсибилизатора). К идеальному фотосенсибилизатору предъявляются ряд требований, в частности, они должны проявлять низкую токсичность в темноте и быть водорастворимыми.

Цель работы состояла в исследовании влияния водорастворимых полимеров на фотокаталитическую активность известных фотосенсибилизаторов и выяснении его структурно-функциональных закономерностей.

В работе были изучены три фотосенсибилизатора порфинового ряда и более 20 водорастворимых полимеров. Было обнаружено, что многие амфифильные полимеры, такие как блок-сополимеры этиленоксида и пропиленоксида (плюроники), полиэтиленоксид, поливиниловый спирт и карбоксиметилцеллюлоза, способны значительно (более чем на порядок) увеличивать фотокаталитическую активность фотосенсибилизаторов порфинового ряда в водном растворе. Выявлены основные закономерности обнаруженного эффекта. В частности, показано, что влияние полимеров вызывается двумя причинами: разрушением порфириновых агрегатов под действием полимеров и концентрированием субстратов и фотокатализатора в полимерной матрице (эффект мицеллярного катализа).

Было показано, что фотодинамическая токсичность хлорина е6 по отношению к раковым фибробластам мышцы в культуре может быть заметно (почти на порядок) повышена под действием ряда полимеров. В работе показано, что комплексы хлорина е6 с полимерами обладают более высокой фототоксичностью, чем его комплексы с белками сыворотки. Результаты, полученные в данной работе, могут быть использованы для создания новых лекарственных форм порфириновых сенсибилизаторов для противоопухолевой и противомикробной терапии.

Работа поддержана грантом РФФИ № 10-02-00381.

**РАЗРАБОТКА БИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ СТЕКЛОКОМПОЗИТОВ
С МЕТАЛЛИЧЕСКИМИ НАНОЧАСТИЦАМИ ДЛЯ НЕИНВАЗИВНОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ГЛЮКОЗЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ
ЧЕЛОВЕКА**

**Development of biosensor based on glass composites with metal nanoparticles
for non-invasive detection of glucose in human biological fluids**

**А.В. НАШЕКИН¹, В.Н. НЕВЕДОМСКИЙ¹, П.А. ОБРАЗЦОВ¹,
О.А. ПОДСВИРОВ², А.И. СИДОРОВ³, К.К. ТУРОВЕРОВ⁴, О.А. УСОВ¹**

¹ Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, С.-Петербург, 194021,
E-mail: nashchekin@mail.ioffe.ru, Fax: +7-812-297-10-17;

² Государственный Политехнический университет, С.-Петербург, 195251;

³ СПбГУ информационных технологий, механики и оптики, С.-Петербург, 197101;

⁴ Институт цитологии РАН, С.-Петербург, 194064.

Экспресс-обнаружение и количественный анализ широкого ряда биологически активных веществ является актуальной проблемой современной медицины. Существует множество подходов к решению проблемы создания биосенсоров (БС) [1], которые, в общем случае, состоят из подложки и чувствительного элемента – биологически активного соединения, специфически взаимодействующего с аналитом (лиганд-связывающим белком, антителом, энзимом и т.д.). Одной из возможных подложек для БС являются стекла с металлическими наночастицами (НЧ), обладающие эффектом локализованного плазмонного резонанса (ЛПР). Использование ЛПР позволяет повышать чувствительность БС, значительно усиливать сигналы флуоресценции биообъектов, а также удешевлять и миниатюризовать конструкцию БС.

В работе представлена технология создания подложек для БС на основе фототерморелактивных (ФТР) стекол с серебряными НЧ [2], исследование их оптических, структурных свойств и анализ взаимодействия НЧ с аналитом. Показано, что НЧ имеют размеры порядка 5–10 нм, располагаются слоями в приповерхностной области стекла и их концентрация в слое достигает $6 \cdot 10^{16} \text{ см}^{-3}$. Характерные пики в спектрах оптического поглощения, связанные с ЛПР в серебряных НЧ, лежат в диапазоне 410–450 нм, положение и ширина линии чувствительны к размеру, форме, материалу и окружающей НЧ матрице. Положение пика, ширина и форма спектральной линии адекватно описываются с помощью обобщенной модели рассеяния света Ми [3]. Оптимизация технологии синтеза НЧ в ФТР стеклах, ведущая к уменьшению ширины линии ЛПР, позволит увеличить эффективность разрабатываемых БС.

В качестве чувствительного элемента разрабатываемого БС на глюкозу нами был выбран D-галактоза/D-глюкоза связывающий белок (GGBP) с присоединенным флуоресцентным красителем баданом. При взаимодействии GGBP с глюкозой наблюдается трехкратное увеличение интенсивности флуоресценции красителя. Этот белок был успешно иммобилизован на поверхности стекол. Показано, что вблизи слоев серебряных наночастиц наблюдается значительное усиление регистрируемого сигнала.

Работа поддержана грантом Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине».

1. J. Homola, *Chem. Rev.* 108, 462-493 (2008).

2. Vostokov, et. al. *Technical Physics Letters*, 35(17), 35-40 (2009).

3. Kreibig, U., et. al. *Optical properties of metal clusters*. Springer-Verlag, Berlin (1995).

**ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ КОМПОНЕНТОВ
БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ РЕАКЦИИ БАКТЕРИЙ В ВЯЗКИХ СРЕДАХ**
Fluorescence spectroscopy study of the components of bacterial bioluminescent reaction
in viscous media

Елена **НЕМЦЕВА**^{1,2}, Дмитрий **ГУЛЬНОВ**², Марина **ГЕРАСИМОВА**²,
Валентина **КРАТАСЮК**^{1,2}

¹Сибирский федеральный университет, Красноярск, 660041, Россия;
E-mail: nev@lan.krasu.ru; Fax: +7-391-244-87-81;

²Институт биофизики СО РАН, Красноярск, 660036, Россия

Вязкие, структурированные среды могут служить экспериментальной моделью условий, в которых протекают ферментативные реакции внутри клеток. С целью моделирования ферментативных процессов *in vivo* ранее была изучена биолюминесценция биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза-бактериальная люцифераза в вязких средах, содержащих сахарозу, глицерин, желатин и крахмал [1]. Было установлено, что возможно как ингибирование, так и активация биохимической реакции. Одним из механизмов этих эффектов является взаимодействие между компонентами среды и участниками ферментативного процесса, что может быть исследовано методами флуоресцентной спектроскопии [2]. Целью данной работы являлось изучение характеристик флуоресценции ферментов – бактериальной люциферазы и NADH:FMN-оксидоредуктазы, и их субстратов – никотинамид-адениндинуклеотида (NADH) и флавинмононуклеотида (FMN), в вязких средах.

Для указанных компонентов были зарегистрированы спектры испускания и возбуждения, анизотропия и время жизни флуоресценции. Были использованы следующие реактивы: FMN (Serva), глицерин и NADH (Gerbu), желатин (Fluka), сахароза и картофельный крахмал (Sigma). Измерения проводили с помощью спектрофлуориметров Aminco Bawman Series 2 (Thermo Spectronic, USA) и Fluorolog 3-22 (Horiba, Jobin Yvon, France) при 20°C.

Зарегистрированы гипсохромные сдвиги спектров флуоресценции ферментов и NADH (на 5–15 нм), обусловленные замедленной релаксацией окружения в вязких средах. Полученный характер изменения анизотропии флуоресценции нуклеотидов с ростом вязкости говорит о возможном изменении их гидродинамического объема, что может быть причиной затрудненного связывания субстратов с ферментами. Спектральные характеристики нуклеотидов говорят об взаимодействии компонентов сред с нефлуоресцирующей частью этих молекул (рибитилфосфат – в FMN, аденин – в NADH). Собственная флуоресценция ферментов в вязких средах указывает на отсутствие существенных конформационных изменений белковых молекул, но свидетельствует о возможном попадании вязких косольвентов в активный центр, что также может влиять на эффективность биохимической реакции. В целом, полученные результаты объясняют механизмы ингибирования биолюминесцентной реакции в присутствии глицерина и сахарозы, но оставляют открытым вопрос о механизмах активации в средах с низкими концентрациями желатина и крахмала.

1. Kratasyuk V., Esimbekova E., Nemtseva E., Sviderskaya I., *Luminescence*, 2010, 25, 196

2. Lakowicz J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, New York, 2006

**НЕИНВАЗИВНЫЙ МОНИТОРИНГ УРОВНЯ ОКСИГЕНАЦИИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ МЕТОДОМ ОПТИЧЕСКОЙ
ДИФФУЗИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ**

**Noninvasive monitoring of experimental tumors oxygenation
using diffuse optical spectroscopy**

**Анна ОРЛОВА¹, Анна МАСЛЕННИКОВА^{1,2}, Герман ГОЛУБЯТНИКОВ¹,
Татьяна ПРЯНИКОВА^{1,3}, Владимир ПЛЕХАНОВ¹, Людмила СНОПОВА²,
Ирина ИВАНОВА², Владислав КАМЕНСКИЙ¹, Наталия ШАХОВА^{1,2}, Илья ТУРЧИН¹**

¹ Учреждение Российской академии наук Институт прикладной физики РАН, 603950 Н. Новгород, ул. Ульянова, 46, Россия;

E-mail: orlova@ufp.appl.sci-nnov.ru; тел/факс: +7-831-416-48-04/+7-831-436-37-92;

² Нижегородская государственная медицинская академия, 603005 Н. Новгород, Россия;

³ Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603950 Н. Новгород, Россия

Кислородный статус опухоли рассматривается в настоящее время как один из ключевых факторов, определяющих прогноз заболевания и эффективность проводимого лечения [1]. Оценка динамики уровня оксигенации в зоне патологии может иметь существенное значение при исследовании ответа новообразования на действие терапии, а также при тестировании агентов, искусственно повышающих кислородный статус гипоксичных опухолей с целью преодоления их резистентности в отношении лечебных воздействий. В настоящей работе для мониторинга экспериментальных новообразований был предложен метод оптической диффузионной спектроскопии (ОДС), позволяющий определить пространственное распределение концентраций окисленной (HbO_2) и восстановленной (ННб) форм гемоглобина, и, соответственно, оценивать параметр, отражающий кислородный статус ткани – степень насыщения крови кислородом (StO_2). В исследовании использовалась экспериментальная опухолевая модель лимфосаркомы Плисса. ОДС проводилась на установке, разработанной в ИПФ РАН [2]. На примере действия химиотерапевтического агента циклофосфана и лучевой терапии показаны возможности метода для неинвазивного прижизненного исследования уровня StO_2 опухоли в ходе лечения. В обоих случаях выявлено повышение уровня насыщения крови кислородом по сравнению с нелечеными животными. Наблюдаемая динамика объясняется увеличением содержания HbO_2 и снижением концентрации ННб. Произведена оценка эффективности направленного повышения кислородного статуса тканей с использованием препарата, улучшающего микроциркуляторную перфузию – пентоксифиллина. Данный препарат вызывал временный рост уровня StO_2 в проекции опухолевого узла, определяемый повышением содержания окисленной формы гемоглобина. Таким образом, метод ОДС позволяет оценивать параметры оксигенации экспериментальных новообразований при различных воздействиях и может быть использован в экспериментальной онкологии для разработки новых подходов к лечению.

1. Vaupel P., *Oncologist*, 2008, 13, 21.

2. Maslennikova A.V., Orlova A.G., Golubiatnikov G.Yu., Kamensky V.A., Shakhova N.M., Babaev A.A., Snopova L.B., Ivanova I.P., Plekhanov V.I., Priyanikova T.I. and Turchin I.V., *Journal of Biophotonics*, 2010, 3(12), 743.

**АНАЛИЗ УЧАСТИЯ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ПРОЦЕССЕ ГЕНЕРАЦИИ
ВАРИАБЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ**
**Analysis of calcium ions participation in the process of higher plants
variable potential generation**

**Л.А. ОРЛОВА¹, Е.К. АКИНЧИЦ¹, Е.А. СЕРГЕЕВА², А.Л. ГРИБКОВ^{1,2},
В.А. ВОДЕНЕЕВ¹**

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского, Нижний Новгород, 603950, Россия; E-mail: v.vodeneev@mail.ru;

²Институт прикладной физики РАН, г. Нижний Новгород, 603950, Россия

Генерация переменного потенциала является одной из первичных реакций высшего растения на внешнее повреждающее раздражение [1,2]. Формирование ВП связывают как правило с переходным угнетением активности электрогенного насоса плазматических мембран [3]. Однако нельзя исключать того, что в процессе генерации ВП, наряду с электрогенным насосом, возможно участие пассивных ионных потоков, в пользу чего свидетельствует сложный характер развития реакции, в частности, быстрое изменение потенциала переднего фронта ВП и наличие импульсов. Целью данной работы явилось изучение ионной природы генерации ВП у высших растений, в частности анализ роли ионов Ca^{2+} в процессе формирования ВП. Объектом исследования служили 2-х недельные проростки пшеницы *Triticum aestivum* L. и тыквы *Cucurbita pepo* L. Регистрацию электрической активности осуществляли с помощью Ag/AgCl макро- и микроэлектродов. Для регистрации изменения внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} использовали метод конфокальной микроскопии в сочетании с флуоресцентным Ca^{2+} -чувствительным зондом Fluo-4/AM. Загруженный Fluo-4 участок стебля в ячейке со стандартным раствором помещали на столик микроскопа. Флуоресценцию регистрировали по двум каналам: первый канал регистрации (500–550 нм) соответствовал флуоресценции зонда, второй канал (650–710 нм) – автофлуоресценции хлоропластов. Спектральный анализ полученных изображений выявил наличие максимума интенсивности флуоресценции, который соответствует максимуму флуоресценции зонда. Далее нами была проведена регистрация интенсивности флуоресценции зонда Fluo-4/AM во времени наряду с одновременной регистрацией электрической активности. При нанесении ожога индуцировался распространяющийся ВП, наряду с которым происходит регистрируемое увеличение интенсивности флуоресценции на фазе деполяризации, что может быть обусловлено возрастанием концентрации внутриклеточного кальция.

Таким образом, было выявлено, что при генерации ВП происходит возрастание концентрации внутриклеточного свободного Ca^{2+} , при этом исключение ионов Ca^{2+} из внеклеточной среды приводит к подавлению формирования реакции. Полученные результаты свидетельствуют о непосредственном участии пассивных потоков ионов Ca^{2+} в процессе генерации ВП у высших растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 09-04-97085).

1. Julien J.L., Frachisse J.M., *Can. J. Bot.*, 1992, 70, 1451

2. Оприлов В.А., Пятагин С.С., Ретивин В.Г. Москва: Наука, 1991

4. Zimmermann M.R., Felle H.H., *Planta*, 229, 539

**КАРОТИНОИДЫ В СТЕКЛОВИДНОМ ТЕЛЕ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА НА РАННИХ
СТАДИЯХ ПРЕНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ**

**Carotenoids in the vitreous body of the human eye at early stages of prenatal
development**

**И.Г. ПАНОВА¹, М.А. ЯКОВЛЕВА², А.С. ТАТИКОЛОВ³, Т.Б. ФЕЛЬДМАН²,
Р.А. ПОЛТАВЦЕВА³, Г.Т. СУХИХ³, М.А. ОСТРОВСКИЙ²**

¹Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, ул. Вавилова 26, Москва, 119334, Россия;

E-mail: pinag@mail.ru; Phone: +7-499-135-55-07;

²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 119334, Россия;

³НЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова РАМН, Москва, Россия

В стекловидном теле плодов человека с 15-й по 28-ю неделю обнаружены каротиноиды – лютеин и его окисленные формы. Уже на 30-й неделе у плодов, как и в стекловидном теле взрослого человека, лютеин практически полностью отсутствует. В стекловидном теле плодов человека в исследуемый период концентрация и общее содержание лютеина коррелируют с концентрацией и общим содержанием сывороточного альбумина. Превышение концентрации альбумина над каротиноидами более чем в 40 раз обеспечивает наилучшее связывание каротиноидов с альбумином для их депонирования и сохранения в стекловидном теле, а также транспортировки каротиноидов в ткани-мишени развивающегося глаза. Антиоксидантные свойства каротиноидов могут обеспечивать защиту сетчатки и хрусталика, а также самого стекловидного тела, от окислительного стресса в развивающемся глазу.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 09-04-01054а, 10-03-00647а).

**МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ И ВЫЯВЛЕНИЕ
СТРУКТУРНЫХ ДЕТЕРМИНАНТ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ
GFP-ПОДОБНЫХ БЕЛКОВ**
**3D-structure modeling and elicitation of structural determinants
of GFP-like proteins fluorescence**

Алексей А. ПАХОМОВ, Владимир И. МАРТЫНОВ

Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, 117997, Россия;
E-mail: alpah@mail.ru; Fax: +7-495-336-63-66

Основным методом определения пространственной структуры белков является метод кристаллографии, однако, для предсказания структуры часто применяется метод гомологичного моделирования. В отличие от обычных белков, GFP-подобные флуоресцентные белки содержат хромофор, синтезирующийся автокаталитически в результате циклизации основной цепи полипептида. Эта особенность осложняет гомологичное моделирование флуоресцентных белков и требует привлечения дополнительных методологий для учета присутствующего в структуре хромофора. В данной работе для установления структуры флуоресцентных белков был использован метод объединяющий гомологичное моделирование *in silico* для определения общей пространственной структуры белка и эксперименты *in vitro* для установления структуры хромофора. Экспериментальное установление структуры хромофора включает в себя выделение из белка небольшого хромофорсодержащего пептида и последующий его масс-спектрометрический анализ. На первом этапе работы была проверена применимость метода к GFP-подобным белкам на примере белка Kaede с использованием EosFP в качестве шаблона. Было показано, что метод дает довольно высокое совпадение модели с установленной ранее кристаллической структурой [1]. На следующей стадии метод был применен для выявления структурных детерминант желтой флуоресценции в белке ρ hYFP. Данный белок имеет дополнительный батохромный сдвиг в 10 нм по сравнению с широко распространенным EYFP и по своим спектральным характеристикам близок к гомологу из *Zoanthus* sp., zFP538. Согласно данным масс-спектрометрического анализа выделенного из белка хромофорсодержащего пептида хромофор ρ hYFP идентичен таковому в GFP. За значительный батохромный сдвиг согласно данным моделирования пространственной структуры отвечают в основном аминокислотные остатки из окружения хромофора Trp203, Val205 и Thr65, участвующие в стекинг взаимодействиях с хромофором и образующие специфическую для ρ hYFP сеть водородных связей [2]. Таким образом, представленный метод наряду с кристаллографией может быть использован для анализа структурных факторов, отвечающих за спектральные свойства флуоресцентных белков.

Работа выполнена при поддержке Российской фонда фундаментальных исследований (№ 09-04-00212; № 10-04-00471).

1. Пахомов А.А., Мартынов В. И., *Биоорган. химия*, 2011, 37 (3), 429 – 432.

2. Pakhomov A. A., Martynov V. I., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011, 407 (1), 230-235.

ГОЛОГРАФИЧЕСКИЕ СЕНСОРЫ КОМПОНЕНТОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

Holographic sensors of components of biological fluids

Владимир ПОСТНИКОВ¹, Александр КРАЙСКИЙ², Тахир СУЛТАНОВ²

¹ФГУ НИИ физико-химической медицины ФМБА России, 119435, г.Москва, ул. Малая Пироговская, д.1а, E-mail: vadpostnikov@mail.ru; Fax: +7-499-246-44-01;

²Учреждение РАН Физический институт им. П.Н.Лебедева, Москва

Голографические сенсоры являются усовершенствованием давно известных денисюковских голограмм на основе фоточувствительных эмульсий бромида серебра [1] и представляют собой нанокompозитные материалы, состоящие из полимерной гидрогелевой пленки, в нанопорах которой размещаются наночастицы серебра, образующие периодические слои так, что при отражении белого света отражается только компонента излучения, резонансная периоду слоев. В пленку встроены вещества, обеспечивающие селективное взаимодействие с искомым компонентом анализируемой смеси, что приводит к набуханию или сжатию гидрогелевой матрицы. Результатом этого является изменение периода слоев, что приводит к изменению отражаемой длины волны, т.е. изменению цвета сенсора.

В качестве поддерживающей среды для фоточувствительных эмульсий синтезировали гидрогелевые матрицы на основе сополимеров акриламида с N-акрилоил-м-аминофенилборной кислотой и N-акрилоил-глюкозамин, сшитые N,N'-метилден-бис-акриламидом различного состава, иммобилизованные на поверхность предметных стекол. Модельные растворы ($1-20 \times 10^{-3}$ моль/л) глюкозы готовили в 0,01 М растворе глицина, содержащем 0,14 М NaCl. Голографический отклик сенсоров – изменение длины волны отраженного света при освещении широкополосным источником, при помещении сенсоров в растворы глюкозы контролировали малогабаритным оптоволоконным спектрометром FSD-8.

Область проявления отклика сенсоров зависит от длины волны лазера, используемого при записи голограмм (632,8 нм, 532 нм), и состава гидрогелевых матриц. Так для сенсоров, записанных с помощью He-Ne лазера (632,8 нм) на основе сополимеров акриламида с аминофенилборной кислотой при увеличении содержания глюкозы длина волны отраженного света лежит в интервале 700–900 нм (в зависимости от степени сшивки), в то время как при использовании матриц, содержащих одновременно глюкозамин и аминофенилборную кислоту, отклик проявляется в видимой области спектра (450–700 нм). Сравнение различных сенсоров глюкозы позволяет выбрать наиболее перспективные системы как с точки зрения величины отклика на 1 ммоль глюкозы, так и области его проявления. Для анализа содержания глюкозы в плазме крови больных диабетом использовали образцы сенсоров размером 1 см², помещенные в специальную ячейку, позволяющую одновременно вводить 9 образцов плазмы в количестве 70 мкл.

Работа поддержана грантом программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Фундаментальные науки – медицине”.

1. А.В. Крайский, В.А. Постников и др. *Квантовая электроника*, 40, 178, (2010).

ЛАБОРАТОРНЫЕ И ЛИДАРНЫЕ (ДИСТАНЦИОННЫЕ) ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕКТРОВ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ЛИСТЬЕВ ЗЕЛЁНЫХ РАСТЕНИЙ

Laboratory and lidar research the spectrum of fluorescence leafy green vegetables

Г.Г. МАТВИЕНКО¹, А.Н. ИГЛАКОВА¹, В.К. ОШЛАКОВ¹, В.Е. ПРОКОПЬЕВ²

¹Институт оптики атмосферы СО РАН, Томск, 634055, пр. Академический 1, Россия

²Институт сильноточной электроники СО РАН, Томск, 634055, пр. Академический 2/3, Россия, prokop@ogl.hcei.tsc.ru

Наиболее чувствительным способом определения состояния растительного покрова (РП), в частности интенсивности фотосинтеза, является измерение спектров флуоресценции. Дистанционное (лидарное) зондирование позволяет оценивать динамику развития и состояние РП в зависимости от различных факторов внешней и внутренней среды с различной степенью генерализации представляемой информации: от глобальных исследований в масштабах стран, регионов и континентов до небольших участков растительности. В настоящее время при лидарных исследованиях флуоресценции РП измеряются не спектры флуоресценции, а применяется дифференциальная методика измерения сигнала на двух длинах волн вблизи 685 нм и 730+740 нм. При этом полагается, что эти измерения эквивалентны спектральным. Следует отметить, что изменения параметров спектральных характеристик РП, вызванные различными стрессовыми факторами зачастую имеют сходный характер.

В настоящей работе приведены результаты лабораторных и натуральных лидарных исследований спектральных характеристик (спектры отражения, возбуждения флуоресценции и флуоресценции) листьев берёзы и хвой сосны в течение весенне-летнего-осеннего вегетационного периода (лето-осень (2010 г.), зима-весна (2011 г.)).

Целью исследований являлось определение наиболее стабильных и значимых (информационных) характеристик отражения и флуоресценции РП. Натурные эксперименты проводились в условиях инсоляции.

В лабораторных исследованиях были использованы стандартные спектроскопические приборы фирмы Hitachi и флуоресцентный микроскоп ЛЮМАМ-3 соединенный со спектроанализатором. В натуральных исследованиях использовалась традиционная схема лидарного зондирования. Для возбуждения лазерно-индуцированной флуоресценции использовался непрерывный лазерный источник мощностью 150–350 мВт работающий на длине волны излучения 532 нм. Дистанция до объекта 50–100 метров. Регистрация спектров отражения инсоляции и сигналов флуоресценции РП и в том, и в другом случаях осуществлялась с помощью многоканального спектроанализатора высокого разрешения HR4000 (Ocean Optics) – спектральный диапазон 195–1100 мкм, схема Черни-Тёрнера, дифракционная решетка 300 штрихов/мм, входная щель 25 мкм.

В докладе представлены лабораторные и натурные спектры поглощения, флуоресценции и возбуждения флуоресценции листьев и хвой растений. Натурные спектры флуоресценции и отражения получены в дневное и сумеречное время. Полученные результаты и численные оценки демонстрируют возможность проведения дистанционных исследований спектров флуоресценции РП относительно маломощными лидарными системами.

**СПЕКТРАЛЬНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЕ И КИНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ ЭЛЕКТРОННОГО ВОЗБУЖДЕНИЯ
В СМЕШАННЫХ ПАРАХ ОКСА- И ТИАКАРБОЦИАНИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ
В КОМПЛЕКСЕ С ДНК**

**Spectral-fluorescent and kinetic study of electronic excitation energy transfer
in mixed pairs of oxa- and thiacyanine dyes bound to DNA**

Павел ПРОНКИН, Александр ТАТИКОЛОВ

Учреждение Российской академии наук Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 119334, г. Москва, ул. Косыгина, д.4, Россия;
E-mail: pronkinp@gmail.com; Fax: +7-495-137-41-01

Исследован перенос энергии электронного возбуждения (ПЭЭВ) между молекулами карбоцианиновых красителей, нековалентно связанных с ДНК. В качестве красителей-доноров энергии электронного возбуждения использовались 3,3',9-триэтил-5,5'-диметилноксакарбоцианиниодид (D1) и 3,3'-диметил-9-этилоксакарбоцианиниодид (D2); в роли красителя-акцептора выступал 3,3'-диэтилтиакарбоцианиниодид (A).[1] Полиметиновые (цианиновые) красители способны образовывать с ДНК нековалентные комплексы; красители-лиганды в такой системе сближены; комплексообразование цианиновых красителей сопровождается резким (в десятки раз) ростом квантового выхода флуоресценции. Все это является благоприятным фактором для регистрации ПЭЭВ [2, 3]. Измерена кинетика затухания флуоресценции доноров и ее тушение акцептором в присутствии ДНК. При интерпретации экспериментальных данных использовалась микрофазная модель [4, 5]; при этом учитывалось концентрирование молекул красителей вблизи молекул ДНК.

Показано, что при тушении флуоресценции красителей-доноров красителем-акцептором динамическое (диффузионное) тушение не играет существенной роли, и тушение осуществляется главным образом по статическому механизму, что вызывает отклонение вверх и вогнутость экспериментальных зависимостей Штерна-Фольмера.

Авторы выражают благодарность проф. Б.И. Шапиро (НЦ НИИХИМ-ФОТОПРОЕКТ) за предоставление полиметиновых красителей, а также В.Ю Гаку (Институт проблем химической физики РАН) за помощь в проведении измерений кинетики флуоресценции.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 10-03-00647.

1. Пронкин П.Г., Татиолов А.С., *Химия высоких энергий*, 2011, 45 (2), 169.
2. Пронкин П.Г., Татиолов А.С., Аниковский М.Ю., Кузьмин В.А., *Химия высоких энергий*, 2005, 39 (4), 280.
3. Пронкин П.Г., Татиолов А.С., *Химия высоких энергий*, 2009, 43 (6), 527.
4. Березин И.В., Мартинек К., Яцмирский А.К., *Успехи химии*, 1973, 42 (10), 1729.
5. Kuzmin, M.G. and Zaitsev, N.K., *The Interface Structure and Electrochemical Processes at the Boundary Between Two Immiscible Liquids*, Berlin: Springer, 1987, p. 207.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЦИКЛОФОСФАНА НА УРОВЕНЬ НАСЫЩЕНИЯ
КРОВИ КИСЛОРОДОМ ОПУХОЛЕВОЙ МОДЕЛИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МЕТОДА ОПТИЧЕСКОЙ ДИФФУЗИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ**

**Study of the effect of cyclophosphan on blood oxygen saturation level of tumor model
using the method of diffuse optical spectroscopy**

**Т.И. ПРЯНИКОВА^{1,2}, А.В. МАСЛЕННИКОВА^{1,2,3}, А.Г. ОРЛОВА²,
Г.Ю. ГОЛУБЯТНИКОВ², И.И. ИВАНОВА³, В.И. ПЛЕХАНОВ²,
В.А. КАМЕНСКИЙ², И.В. ТУРЧИН²**

¹ Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского
E-mail: tiryanikova@mail.ru, тел: 8-904-047-08-55

² Институт прикладной физики РАН, г. Н. Новгород, 603950, Россия

³ Нижегородская государственная медицинская академия, г. Н. Новгород, 603005, Россия

Кислородный статус злокачественных новообразований рассматривается как один из факторов, определяющих их устойчивости к действию химиотерапии. Существуют данные, что химиотерапия изменяет уровень оксигенации опухоли. Оценка степени оксигенации новообразования позволяет подобрать условия для оптимизации проводимого лечения. В данной работе для оценки кислородного статуса опухоли предлагается метод оптической диффузионной спектроскопии (ОДС) [1]. Применение различных длин волн позволяет наблюдать тканевые составляющие, такие как окси- (HbO₂), дезоксигемоглобин (Hb), вода, липиды. По соотношению концентраций окисленной и восстановленной форм гемоглобина оценивают степень насыщения крови кислородом (StO₂), косвенным образом характеризующую уровень оксигенации тканей [2]. Целью работы была оценка возможностей метода ОДС для исследования динамики уровня StO₂ в ткани опухоли в ходе химиотерапии. В эксперименте были использованы белые нелинейные крысы с перевитой подкожно опухолью лимфосаркомой Плисса (ЛСП). ОДС-исследование начинали на 4-й день после перевивки опухоли. Циклофосфан вводили внутривентриально однократно в концентрации 50 мг/кг, в качестве контроля использовали нелеченых животных. Эксперименты показали, в ходе естественного роста опухоли лимфосаркомы Плисса наблюдается снижение уровня оксигенации тканей за счет повышения содержания восстановленного и снижения концентрации окисленного гемоглобина. При действии циклофосфана кислородный статус опухоли лимфосаркомы Плисса нормализуется за счет снижения содержания восстановленной формы гемоглобина. Можно предположить, что действие циклофосфана, направленного на торможение деления и гибель клеток, может привести к снижению потребления кислорода тканью опухоли, и, соответственно, повышению уровня ее оксигенации.

1. Orlova A.G., Turchin I.V., Plehanov V.I. et al. *Laser Physics Letters*. 2008. V. 5. № 4. 321–327.

2. Maslennikova A.V., Orlova A.G., Golubiatnikov G.Yu., et al. *Journal of Biophotonics*. 2010. V. 3 № 12, 743–751.

**МИЦЕЛЛЯРНЫЕ КОНТЕЙНЕРЫ ДЛЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ
ОКСАЛАТОВ КАК ИСТОЧНИК СВЕТА В ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ**
Micellar containers for chemiluminescent oxalates as light sources in PDT

РОМАНИЮК А.В., БОЛТАЕВ У.Т., МЕЛИК-НУБАРОВ Н.С.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, 119991, Ленинские горы, ул. Академика Хохлова, д. 1, стр. 40.
Email: andrei.romanyuk@gmail.com; Факс: +7(495)939-01-74;
Тел.: +7(495)939-31-27; Моб.: +7(916)600-71-16.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) представляет собой интенсивно развивающийся метод терапии, включающий фотохимическое взаимодействие трех компонентов: света, фотосенсибилизатора и кислорода. За последние двадцать лет достигнут колоссальный прогресс как в техническом развитии всех составляющих, так и в понимании биофизического механизма ФДТ. Это метод постоянно внедряется в клиническую практику при лечении поверхностных опухолей и воспалений с нагноением. Несмотря на несомненный успех ФДТ в терапии легкодоступных опухолей, метод все еще имеет некоторые ограничения. Наиболее серьезная проблема заключается в непроницаемости кровов живого организма для света. Мы пытаемся ее преодолеть за счёт создания супрамолекулярных хемилюминесцентных композитов, способных испускать свет при хемилюминесцентной реакции с пероксидом водорода.

В данной работе представлен синтез нескольких водонерастворимых оксалатов, способных к хемилюминесценции в присутствии порфиринов, а также изучена их солубилизация в мицеллах биосовместимых ПАВ. Было обнаружено, что кинетика хемилюминесцентной реакции зависит от природы порфирина и поверхностно-активного вещества, используемых для солубилизации в мицеллах. Полученные результаты указывают на возможность применения оксалиловых эфиров в создании наноразмерных источников света для биологических целей.

НАКОПЛЕНИЕ И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ НАНОЧАСТИЦ

Accumulation and intracellular localization of semiconductor nanoparticles

Saulius BAGDONAS¹, Leona DAMALAKIENE¹, Vitalijus KARABANOVAS^{2,3},
Mindaugas VALIUS³, Ricardas ROTOMSKIS^{1,2}

¹Vilnius University Laser Research Center, Vilnius, LT-10222, Lithuania

E-mail: ricardas.rotomskis@ff.vu.lt; Fax: +370-5-23-660-22;

²Biomedical Physics Laboratory, Vilnius University Institute of Oncology, Vilnius, LT-08406, Lithuania;

³Developmental Biology Department, Vilnius University Institute of Biochemistry, Vilnius, LT-08662, Lithuania

Квантовые точки (КТ) – это полупроводниковые наночастицы, которые обладают интенсивной флуоресценцией и соответствующими физико-химическими свойствами, важными для использования в биомедицине. Механизм накопления и распределения КТ в живых клетках в значительной степени неизвестен, хотя было показано, что наиболее вероятным сценарием является эндоцитоз, опосредованный рецепторами. Накопленные данные свидетельствуют, что перенос наночастиц через клеточную мембрану и внутриклеточная локализация зависят как от типа клеток, так и параметров КТ: размера, поверхностного заряда, структуры покрытия и т.д.

В данной работе представлены результаты исследования специфически ненацеленных отрицательно заряженных карбоксильных КТ (CdSe/ZnS-PEG-COO⁻) в клетках иммортализованных фибробластов NIH3T3 и раковых клетках HpG2-WT и MCF-7. Исследования механизмов накопления проводились методами флуоресцентной спектроскопии и конфокальной микроскопии при использовании селективной блокировки путей эндоцитоза в клетках.

Накопление КТ в клетках блокируется понижением температуры, что указывает на энергетически активируемый процесс и исключает пассивную диффузию через клеточную мембрану. Результаты конфокальной микроскопии показали, что КТ в клетках инкапсулированы в везикулярных структурах, которые изначально сосредоточены в перинуклеарной области. При микроинъекции, использованной для прямого внутриклеточного введения, КТ распределяются равномерно во всей цитоплазме и с течением времени не формируют везикулярных структур. Подробные обследования показали, что: через 5–15 мин после инкубации наночастицы локализуются в клеточной мембране, начиная с 30–60 мин регистрируются первичные везикулы с наночастицами, формирующие скопления в цитоплазме в перинуклеарной области, в дальнейшем число и размер везикул на клетку увеличивается, они равномерно распределяются по всей цитоплазме. Время накопления и количество КТ зависит от типа клеток. В раковых клетках HpG2-WT флуоресценция наночастиц не была зарегистрирована даже через 24 ч после инкубации.

Наши исследования при использовании селективной блокировки путей эндоцитоза в клетках показали, что специфически ненацеленные карбоксильные КТ (CdSe/ZnS-PEG-COO⁻) проникают в клетки путем энергетически активируемого процесса эндоцитоза, который в основном реализуется при участии кавеолина, что не исключает совместной активации других путей эндоцитоза в раковых клетках.

ИЗМЕНЕНИЕ ДИПОЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ОКИСЛЕНИИ НА ПОВЕРХНОСТИ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ

The change of dipole potential due to photodynamic oxidation
on the surface of bilayer lipid membrane

Валерий СОКОЛОВ¹, Алена КУЛАГИНА¹, Елена МАЛИНГРИО¹,
Ирина ПЕРЕВОЩИКОВА¹, Ася САБУРОВА¹, Петер ПОЛЬ²

¹Институт физической химии и электрохимии им. А.Н.Фрумкина РАН, Москва, Россия, Москва, Ленинский просп., 31

sokolovvs@mail.ru

²Institute of biophysics of J.Kepler University, Linz, Austria

Фотодинамическое окисление молекул – мишеней синглетного кислорода регистрировалось по изменению дипольного потенциала, создаваемого этими молекулами на границе бислоистой липидной мембраны (БЛМ), с помощью разработанного нами ранее метода измерения разности граничных потенциалов $\Delta\phi_b$. Мишенями служили соединения, молекулы которых обладают значительным дипольным моментом: классический дипольный модификатор флоридин, а также стироловые красители di-4-ANEPPS, di-8-ANEPPS, RH-421, RH-237. Адсорбция этих соединений, а также фотосенсибилизаторов (алюмофталоцианины, цинковый фталоцианин, бенгальский розовый) на БЛМ приводит к изменению $\Delta\phi_b$. Освещение БЛМ видимым светом после адсорбции на ней мишеней и фотосенсибилизаторов приводило к уменьшению дипольного потенциала, создаваемого молекулами-мишенями. Изменение потенциала при освещении объясняется окислением мишеней синглетным кислородом, образующимся при возбуждении фотосенсибилизаторов. После прекращения освещения потенциал восстанавливался из-за адсорбции на БЛМ неразрушенных молекул-мишеней из водного раствора. Разрушение ANEPPS подтверждали независимые эксперименты, в которых наблюдалось падение флуоресценции этого красителя на липосомах после освещения в присутствии фотосенсибилизатора. Кинетики изменения потенциала при освещении, а также его восстановления в темноте удовлетворительно аппроксимировались экспонентами. По величинам экспоненциальных показателей определяли скорость фотодинамического разрушения мишени. Эта скорость линейно зависела от интенсивности освещения и уменьшалась при добавлении в ячейку азид натрия – тушителя синглетного кислорода. Изменения дипольного потенциала наблюдались в случае, когда молекулы мишени были адсорбированы на той же стороне мембраны, что и молекулы фотосенсибилизатора (цис-фотоэффект), и в случае, когда они были адсорбированы на противоположных границах мембраны (транс-фотоэффект). Сравнение скоростей цис- и транс-фотоэффектов было использовано для оценки проницаемости бислоистой мембраны для синглетного кислорода.

**ФОТОИНДУЦИРОВАННОЕ БИОРАЗЛОЖЕНИЕ УСТОЙЧИВЫХ
ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В ВОДНЫХ СРЕДАХ**
The photoinduced biodegradation of persistent organic compounds in water media

**Ирина СОКОЛОВА¹, Ольга ЧАЙКОВСКАЯ¹, Елена КАРЕТНИКОВА²,
Лев НЕЧАЕВ¹, Николай ВЕРШИНИН¹, Ольга ВУСОВИЧ¹**

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, 634050, Россия;

E-mail: sokolova@phys.tsu.ru; Fax: +7-3822-53-30-34;

²Институт водных и экологических проблем ДВО РАН, Хабаровск, 680000, Россия;

E-mail: micro@ivep.as.khb.ru; Fax: +7-4212-32-57-55

Вовлечение в производственную сферу огромного количества природных ресурсов, синтез новых материалов и веществ, неудержимый рост количества и объемов выпускаемой продукции привели к появлению глобальной проблемы, связанной с утилизацией и захоронением отходов производства и потребления. Появилась необходимость в пересмотре старых и разработке новых технологий, направленных на сбережение ресурсов и охрану окружающей среды. Предлагается оптимизировать процессы биоразложения устойчивых поллютантов с помощью их предварительной фотохимической обработки современными источниками некогерентного излучения – эксилампами [1]. Такое облучение позволяет получить уже биоразлагаемые фотопродукты, в результате значительно повышается эффективность процессов такого комплексного фотохимического и биологического разложения. Для оптимизации этих процессов необходимо связать строение органических молекул экотоксикантов с особенностями их комплексной фотохимической и микробиологической деструкции. Особое внимание уделяется характеристикам различных источников излучения, используемых на первом этапе обработки. Рассмотрены фотопревращения для замещенных фенолов, гербицидов: 2-метил-4-хлорфеноксиуксусной кислоты (МСРА) и 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-D), а также полициклических ароматических углеводородов с последующей биодеградацией. Изучен как прямой, так и сенсбилизированный фотоллиз с участием гуминовых кислот. Использованы гуминовые кислоты различного происхождения, разных способов выделения, с различной предварительной обработкой гуминовых веществ для получения наиболее эффективных природных фотосенсибилизаторов, способных интенсифицировать процессы фотоиндуцированного биоразложения. Токсичность промежуточных и конечных продуктов разложения исследуется современными методами биолюминесцентного мониторинга [2].

Данная работа подтверждает перспективность использования фотоиндуцированного биоразложения для обработки устойчивых ксенобиотиков. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 10-08-90706-моб_ст) и гранта президента РФ на поддержку ведущей научной школы (№ НШ-4297.2010.2).

1. Sosnin E.A., Sokolova I.V., Tarasenko V.F., In Book: *Photochemistry Research Progress* (Eds by A. Sanchez, S.J. Gutierrez). Nova Science Publishers, 2008, 225.

2. Kudryasheva N., J. *Photochem. Photobiol. B: Biology*, 2006, 83 (1), 77

**РЕКОНСТРУКЦИЯ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ СУСПЕНЗИЙ
МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ПО СПЕКТРАМ ОТРАЖЕНИЯ КЛЕТОК,
ОСАЖДЕННЫХ НА СТЕКЛЯННЫХ ФИЛЬТРАХ**

Reconstruction of absorbance spectra of microalgal cell suspensions from reflectance spectra of the cells deposited on glass-fiber filters

Алексей СОЛОВЧЕНКО, Ольга ЧИВКУНОВА, Веньцзянь СУНЬ, Марк МЕРЗЛЯК

Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия;
E-mail: wundy@mail.ru; Fax: +7-495-939-43-09

Исследование образцов фитопланктона в природных условиях и лабораторных культур микроводорослей с низкой плотностью клеток требует применения специальных подходов. Ввиду обычно крайне низкой концентрации клеток в морских акваториях (содержание хлорофилла менее 1 мг/м^3) прибегают к концентрированию клеток (в основном на стеклянных волоконных фильтрах GF/F) с последующим спектрофотометрическим анализом [1, 2]. Эти исследования выявили значительные различия в биооптических свойствах фитопланктона. Нельзя исключить, что наряду с особенностями таксономического состава, особенностями питания, освещенности, температуры [3] и другими экофизиологическими факторами эти различия связаны и с анализом компонентов фитопланктона на фильтрах. Следует также отметить, что широко применялся лишь анализ пропускания фильтров (лишь в работе [4] описан подход, учитывающий потери света, обусловленные отражением).

Настоящая работа посвящена изучению особенности спектроскопии различных групп микроводорослей на стеклянных фильтрах GF/F, а также разработке метода, основанного на реконструкции спектров поглощения суспензий микроводорослей по спектрам клеток, осажденных на фильтры GF/F. Предполагается, что усовершенствованный нами метод найдет широкое применение при проведении экологического мониторинга.

В результате работы выявлены и охарактеризованы существенные различия поглощения света клеточными суспензиями цианобактерий, зеленых и диатомовых водорослей и поглощения света клетками этих микроорганизмов на фильтрах GF/F. Количественные измерения показали, что поглощение света клетками на фильтрах не подчиняются закону Ламберта-Бера. Использование отражения является более предпочтительным с точки зрения точности и воспроизводимости по сравнению с измерениями проходящего света. Количественную обработку спектров на фильтрах следует проводить с использованием функции обратного отражения, $1/R(\lambda)$.

Предложена обобщенная модель, которая для всех изученных микроорганизмов позволяет из спектров отражения света на фильтрах реконструировать спектры поглощения света в клеточных суспензиях.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 09-04-00419).

1. Mitchell B., 1990, Proc. SPIE, *Ocean Optics*, X 1302, 137-148.
2. Mitchell B., Bricaud A., Carder K. et al., 2003, *NASA Tech. Memo*, 209966, 125–153.
3. Bricaud A., Morel A., 1986, *Appl. Optics*, 25, 571-80.
4. Tassan S., Ferrari G., 1995, *Limnol. Oceanogr.*, 40, 1358-1368.

**ФОТОНИКА ПИРЕНОВЫХ МЕТОК, ВСТРОЕННЫХ В КАЧЕСТВЕ
НЕНУКЛЕОЗИДНЫХ ОСНОВАНИЙ В ОДНО- И ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫЕ
ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ**

**Photonics of pyrene units incorporated as nonnucleosidic bases
into single- and double-stranded oligonucleotides**

Александр СТАШЕВСКИЙ, Виктор ГАЛИЕВСКИЙ

Институт физики НАН Беларуси, Минск, 220072, Беларусь;
E-mail: a.stasheuski@ifanbel.bas-net.by; Fax: +375-17-284-08-79

Связывание нуклеотидов с полиароматическими молекулами, обладающими специфическими электронными и спектроскопическими свойствами, даёт простой и эффективный способ визуализации процессов, связанных с функционированием ДНК и РНК, а также применяется при анализе состава нуклеиновых последовательностей. Например, зонды на основе пиренов способны образовывать эксимеры и эксиплексы, полоса флуоресценции которых сдвинута от полосы мономерного свечения пирена на величину порядка 100 нм. Благодаря использованию подобных молекул появился широкий класс гибридизационных зондов, основанных на «переключении» длины волны флуоресценции при соединении с искомой последовательностью нуклеотидов.

Включение меток в зонд может осуществляться различными способами, среди которых особенно перспективным выглядит замена одного или нескольких оснований нуклеиновой цепи ненуклеозидными пиренсодержащими звеньями. В данной работе исследованы фотофизические свойства таких модифицированных пиреном модельных олигонуклеотидов. Методами лазерной кинетической спектроскопии изучена динамика формирования и распада мономерного и эксимерного свечений в зависимости от молекулярной структуры используемого пиренового звена и окружающих его нуклеиновых оснований. Характеристики новых меток определены в составе как одиночных, так и двойных последовательностей. Обработка кинетических данных проводилась с помощью методов наибольшей энтропии и глобального анализа.

Обнаружено, что встраивание флуорофора внутрь нуклеиновой цепи в значительной степени изолирует возбужденные пиреновые молекулы от взаимодействия с водным окружением и тушащего действия кислорода. В исследованных ранее одно- и двухцепочечных модельных олигонуклеотидах на основе молекул карбоксиамидпирена квантовые выходы флуоресценции эксимеров не превышали 26% [1]. В новых соединениях с бистриазолипиренами и бисбутилпиренами квантовые выходы эксимерного свечения оказались более 50%, при этом длительность доминирующего компонента в затухании эксимеров составляла более 60 нс, что почти на порядок больше длительности мономерного сигнала. Следовательно, непосредственно при экспериментах *in vivo* эксимерную люминесценцию с помощью кинетической аппаратуры можно успешно отделить от затрудняющей анализ автофлуоресценции.

Установленные фотофизические характеристики олигонуклеотидных последовательностей, содержащих пиреновые метки, позволяют использовать такие супрамолекулярные структуры в качестве основы для конструирования новых высокочувствительных флуоресцентных зондов.

1. Galievsky V.A., Malinovskii V.L., Stasheuski A.S., Samain F., Zachariasse K.A., Häner R., Chirvony V.S., *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2009, 8, 1448

ЛАЗЕРНЫЙ ФЛУОРОМЕТР ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ СВЕЧЕНИЯ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА *IN VITRO* И *IN VIVO*

Laser lifetime spectrometer for singlet oxygen luminescence detection *in vitro* and *in vivo*

Виктор ГАЛИЕВСКИЙ, Александр СТАШЕВСКИЙ

Институт физики НАН Беларуси, Минск, 220072, Беларусь;
E-mail: a.stasheuski@ifanbel.bas-net.by; Fax: +375-17-284-08-79

Молекулярный кислород участвует во многих биологических и физико-химических процессах и привлекает к себе неослабевающий интерес уже на протяжении достаточно длительного периода времени. При помощи специальных хромофоров-сенситизаторов, поглощающих кванты света и затем передающих энергию молекулярному кислороду, происходит его активация и образуется так называемый синглетный кислород. Данная возбужденная форма молекулы кислорода – основной действующий агент при фотодинамической терапии рака, лечения некоторых кожных и инфекционных болезней.

Ранее нами был создан прибор для изучения *in vitro* кинетик разгорания и затухания сверхслабой люминесценции, в первую очередь синглетного кислорода, со спектральным разрешением в доли нанометра в интервале 950–1400 нм [1].

Новый высокочувствительный лазерный флуорометр разработан для исследования с наносекундным временным разрешением динамики фотосенсибилизированного свечения синглетного кислорода в растворах, биологических тканях и культурах клеток, и позволяет следить за изменением концентрации этой активной формы молекулярного кислорода *in vivo*.

Основу системы регистрации флуорометра составляет быстрый многоканальный счётчик, способный регистрировать все, а не только первые, как в классическом методе время-коррелированного счёта одиночных фотонов, одноэлектронные импульсы, приходящие от ФЭУ, работающего в режиме счёта фотонов. Импульсное возбуждение на длине волны 532 нм осуществляется твердотельным Nd:YAG лазером с диодной накачкой. Частоту повторения импульсов лазера можно варьировать от 200 Гц до 10 кГц. Удобный способ облучения образца и эффективный сбор света обеспечивает световод специальной конструкции. Центральное волокно в жгуте световода на одном из его концов выведено в отдельный рукав и служит для доставки возбуждающих лазерных импульсов. Остальные волокна, собранные во второй рукав, передают люминесценцию через полосовые интерференционные фильтры на фотокатод ФЭУ. Данные фильтры при минимальных потерях света обеспечивают эффективную селекцию на семи длинах волн из диапазона 1050–1350 нм.

Контроль за спектрально-кинетическими характеристиками свечения молекулярного синглетного кислорода позволяет отслеживать появление и исчезновение кислорода в среде, в частности, при фотодинамической терапии и предоставляет возможность оптимизировать световой режим данного способа разрушения опухолей, как в экспериментальной, так и в практической фотомедицине.

1. Галиевский В.А., Сташевский А.С., Киселев В.В., Шабусов А.И., Бельков М.В., Джагаров Б.М., *Приборы и Техника Эксперимента*, 2010, 53 (4), 109

ФОТОНИКА 5-ФТОРУРАЦИЛА И ЕГО КОМПЛЕКСОВ С β -ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ

Photonics of 5-fluorouracil and its complexes with β -cyclodextrin

Михаил СУЛТАНБАЕВ¹, Сергей ОСТАХОВ¹, Сергей ХУРСАН¹, Шамиль ГАНЦЕВ²

¹Институт органической химии УНЦ РАН, Уфа, 450054, Россия;

E-mail: chemlum@anrb.ru; тел./факс: +7-347-235-61-11;

²Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, 450000, Россия

Исследование фотоники противоопухолевого препарата 5-фторурацила (FU) представляет особый интерес, поскольку он является синтетическим аналогом урацила и тимина – структурных элементов нуклеиновых кислот.

Целью настоящей работы являлось спектрально-люминесцентное изучение оксо-гидроксо таутомерии FU, флуоресцентных (ФЛ) свойств таутомеров, состава и устойчивости комплексов включения по типу “гость-хозяин” 5-фторурацила с β -циклодекстрином (CD).

В соответствие с литературными данными, основанными на квантово-химических расчетах, из 6 возможных наиболее устойчивы 4 таутомера 5-фторурацила: 2,4-диоксо (**I**), 2-гидрокси-4-оксо (**II**), 4-гидрокси-2-оксо (**III**) и 2,4-дигидрокси (**IV**).

Нами были исследованы спектры ФЛ таутомеров FU в нейтральных водных растворах, определены максимумы ФЛ (λ_{\max}), оценены квантовые выходы (ϕ) их флуоресценции и процентное содержание ($c\%$), составившие: **I** – $\lambda_{\max} = 340$ нм, $\phi = 1,5 \times 10^{-4}$, $c\% = 99,5$; **II** – $\lambda_{\max} = 380$ нм, $\phi = 2,1 \times 10^{-2}$, $c\% = 0,4$; **III** – $\lambda_{\max} = 410$ нм, $\phi = 0,6$, $c\% = 0,03$; **IV** – $\lambda_{\max} = 440$ нм, $\phi = 0,35$, $c\% = 0,008$.

Изучены спектры ФЛ таутомеров FU в зависимости от содержания β -циклодекстрина. Установлено, что CD образует комплексы эквимольного состава 1:1 (или 2:2) с 2,4-диоксо-5-фторурацилом и не взаимодействует с минорными таутомерами **II-IV**. Определена константа равновесия комплексообразования таутомера **I** с CD ($K = 30$ л/моль) и квантовый выход ФЛ комплекса [**I**•CD] ($\phi_k = 4 \times 10^{-4}$). Увеличение квантового выхода ФЛ при комплексообразовании ($\phi_0 = 1,5 \times 10^{-4}$) объясняется экранированием включенного в полость CD электронно-возбужденного FU от “тушащего” влияния растворителя. Из полученных результатов следует, что в супрамолекулярных комплексах включения CD с FU, моделирующих его свойства в полости биологических объектов по типу “гость-хозяин”, 5-фторурацил находится в диоксо-форме **I** и доля токсичных гидроксо-таутомеров **II-IV** в живых системах ничтожно мала.

Установлено, что ФЛ 5-фторурацила при прямом возбуждении во вторую или более коротковолновые полосы поглощения осуществляется не только с первого синглетно-возбужденного S_1 -уровня, но и при переходе со второго S_2 -уровня на основной (нарушение закона Вавилова о независимости квантового выхода ФЛ от частоты возбуждающего света).

Обнаружен фотоиндуцированный перенос протона в твердых образцах 5-фторурацила, приводящий к образованию его редких таутомерных форм, которые, в отличие от растворов, стабилизируются кристаллической матрицей.

**МЕЗО-ЗАМЕЩЕННЫЕ ПОЛИМЕТИНОВЫЕ КРАСИТЕЛИ – ЭФФЕКТИВНЫЕ
СПЕКТРАЛЬНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ЗОНДЫ ДЛЯ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ**
*Meso-substituted polymethine dyes as efficient spectral-fluorescent probes
for biomacromolecules*

Александр **ТАТИКОЛОВ**¹, Тимофей **АКИМКИН**¹, Алексей **КАШИН**¹,
И.Г. **ПАНОВА**², Сергей **ЯРМОЛЮК**³

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина 4, Москва, 119334, Россия;

E-mail: tatikolov@sky.chph.ras.ru, tatikolov@mail.ru; Phone: +7-495-939-71-71;

²Институт биологии развития им. Н.К. Колцова РАН, ул. Вавилова 26, Москва, 119334, Россия;

³Институт молекулярной биологии и генетики Национальной академии наук Украины, Киев, 252143, Украина

Поиск простых и удобных методов изучения биологических объектов, в частности, использование красителей-зондов, является важным для исследовательских и экспериментальных целей. Такими зондами могут служить *мезо*- (или 9-) замещенные полиметиновые красители. В незамещенных полиметиновых (цианиновых) красителях *цис*-изомер обычно имеет более высокую энергию, чем *транс*-изомер, и *транс-цис* равновесие сдвинуто в сторону *транс*-изомера. В *мезо*-замещенных тиакрбодицианиновых красителях *транс*- и *цис*-изомеры сравнимы по энергии вследствие стерических препятствий, и *транс-цис* равновесие становится подвижным, сдвигается в ту или другую сторону в зависимости от среды. Это делает *мезо*-замещенные цианиновые красители перспективными для использования в качестве спектрально-флуоресцентных зондов для биомакромолекул. Один из таких красителей – 3,3'-ди(сульфопропил)-4,5,4',5'-добензо-9-этилтиакрбодицианин-бетаин – был использован нами в качестве зонда для анализа внеклеточных сред глаза человека и некоторых животных на альбумин и коллагены [1]. Нами изучено нековалентное взаимодействие ряда других *мезо*-замещенных цианиновых красителей с биомакромолекулами: анионных – с альбуминами [2], катионных – с ДНК [3], гиалуроновой кислотой [4], хондроитин-сульфатом. Некоторые из данных красителей рекомендованы нами для использования в качестве зондов для биомолекул.

Таким образом, *мезо*-замещенные полиметиновые красители могут служить эффективными спектрально-флуоресцентными зондами для различных биомакромолекул при изучении биологических объектов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ 10-03-00647а, 09-04-01054а).

1. Panova I.G., Sharova N.P., Dmitrieva S.B., Poltavtseva R.A., Sukhikh G.T., Tatikolov A.S. *Anal. Biochem.*, 2007, 361, 183.

2. Кашин А.С., Татиколов А.С. *Химия высоких энергий*, 2009, 43 (6), 536.

3. Акимкин Т.М., Татиколов А.С., Ярмолук С.М. *Химия высоких энергий*, 2011, 45 (3), 252.

4. Акимкин Т.М., Татиколов А.С., Панова И.Г., Ярмолук С.М. *Химия высоких энергий*, 2011, в печати.

**ГИПЕРТЕРМИЯ ОПУХОЛЕЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ
ПЛАЗМОННО-РЕЗОНАНСНЫХ НАНОЧАСТИЦ
В МОДЕЛЬНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ**

Hyperthermia cancer using plasmon-resonant nanoparticles in model experiments

**ТЕРЕНТЮК Г.С.¹, МАКСИМОВА И.Л.¹, ИНОЗЕМЦЕВА О.А.¹, ТЕРЕНТЮК А.Г.¹,
ХЛЕБЦОВ Б.Н.², ХЛЕБЦОВ Н.Г.^{1,2}**

¹ Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83; e-mail: vetklinika@front.ru тел-89272261302

² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, 410049, г. Саратов, просп. Энтузиастов, д. 13

Уникальные физические свойства плазмонно-резонансных наночастиц используются для диагностики и в терапевтических технологиях. Золотые наночастицы с настраиваемым плазмонным резонансом привлекли внимание своим огромным коэффициентом оптического поглощения и потенциалом как вводимые фотопоглощающие агенты, которые фиксируются в опухоли и преобразуют электромагнитное излучение в разрушающую тепловую энергию. На текущий момент для разрушения поверхностных опухолей с низким поглощением энергии в клинической практике используется радиочастотная, лазерная и ультразвуковая методики.

Невозможность избирательно нагревать ткани опухоли, не нагревая окружающие ткани, используя выше перечисленные методы, делает необходимым локализовать энергию в опухолевых тканях, что позволит эффективно повреждать опухоль в целом и её границы в частности. Выступая как источник внутриопухолевого тепла, наночастицы могут быть применены для термотерапии путем их сочетания с существующими методиками и уменьшить смертность по сравнению с не локальной термотерапией. На сегодняшний день создание золотых наношеллов и наностержней показали возможность эффективного разрушения опухоли, используя лазерное излучение в ближнем ИК диапазоне.

В работе экспериментально исследованы процессы динамики температурного распределения при лазерном облучении модельных объектов с различной концентрацией наночастиц. Количественно исследовано пассивное накопление наночастиц в опухолевых тканях и их распределение при системном введении в органах лабораторных животных с перевитыми опухолями. Предложен ряд методик малоинвазивного воздействия для эффективного введения наночастиц в поверхностные новообразования. С использованием оптической томографии и спектроскопии диффузного светорассеяния проанализированы особенности локализации наночастиц в приповерхностных слоях биоткани.

Результаты отражают клиническую применимость данной технологии и мотивируют к дальнейшему развитию методик для оптимизации режимов облучения, которые будут улучшать лазерную фототермальную терапию.

**МОДЕЛИРОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ АКТИВНОГО ФОТОПРОТЕИНА
ОБЕЛИНА КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ**
Modeling of obelin active photoprotein formation by quantum chemical methods

**Феликс ТОМИЛИН^{1,3}, Любовь АНТИПИНА¹, Евгений ВЫСОЦКИЙ²,
Сергей ОВЧИННИКОВ^{1,3}**

¹Институт физики им. Л.В. Киренского СО РАН, 660036, Красноярск, Россия;
E-mail: felixnt@gmail.com; факс: +7-3912-43-89-23;

²Институт биофизики СО РАН, 660036, Красноярск, Россия;

³Сибирский Федеральный Университет, 660041, Красноярск, Россия

Ca²⁺-регулируемые фотопротейн обелин определяет свечение морского гидроида *Obelia longissima*. Фотопротейн представляет собой стабильный фермент-субстратный комплекс, состоящий из односубъединичного полипептида и «преактивированного» кислородом субстрата, 2-гидропероксицелентеразина (CLZ-ООН), прочно, но нековалентно связанного с белком. В литературе предлагается несколько механизмов образования CLZ-ООН. Во всех случаях предполагается, что процесс идет через образование аниона. Сначала происходит образование аниона CLZ(7-), который легко перестраивается в анион CLZ(2-), далее происходит образование гидроперекиси, из которой и образуется целентерамид входе дальнейшей биолюминесцентной реакции.

В данной работе проведено моделирование с помощью квантово-химических методов. Показано, что учет электронных корреляций дает структуру более близкую к экспериментальной и позволяет выбрать форму целентеразина CLZ(1Н) как наиболее вероятную из возможных изомерных форм. Целентеразин в протонных растворителях находится в изомерной форме CLZ(1Н), в аprotонных – в форме CLZ(7Н). Образование формы CLZ(2Н) в растворителях не происходит. В отличие от растворителей, в белке обелине целентеразин находится в форме CLZ(2Н). Активация целентеразина молекулой кислорода с образованием молекулы CLZ-ООН возможна только для структуры CLZ(2Н). Изомерная форма CLZ(2Н) может образовываться только при захвате целентеразина белковым окружением.

Показано, что ван-дер-ваальсово взаимодействие влияет на процесс формирования CLZ-ООН. Присутствие полярной молекулы, которая благодаря индукционному эффекту перераспределяет заряды в молекуле целентеразина, приводит к стабилизации комплекса «CLZ(2Н)-O₂». Рассчитана энергия активации реакции образования CLZ-ООН. Барьер для реакции составляет 68 кДж/моль, ΔН=60 кДж/моль, что хорошо согласуется с экспериментальными данными: E_{активации} = 57,4 кДж/моль, ΔН=55 кДж/моль.

Авторы выражают благодарность ФЦП «Кадры» ГК-П333, интеграционному проекту СО РАН №2, межведомственному суперкомпьютерному центру РАН г. Москва МВС-100К и комплексу высокопроизводительных вычислений ИКИТ Сибирского федерального университета.

**КОНЬЮГАТЫ ХЛОРИНА E6 С БИС(ДИКАРБОЛИДОМ) КОБАЛЬТА:
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ СВОЙСТВА ПРИМЕНИТЕЛЬНО
К ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ И БОР-НЕЙТРОН ЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ**
Conjugates of chlorin e6 with boron nanoparticles: molecular and cellular properties
for photodynamic and boron-neutron capture therapy

Алексей **ФЕОФАНОВ**¹, Анастасия **ИГНАТОВА**¹, Мария **АСТАПОВА**¹,
Анастасия **ЕФРЕМЕНКО**^{1,2}, Игорь **СИВАЕВ**³, Владимир **БРЕГАДЗЕ**³,
Михаил **ГРИН**², Андрей **МИРОНОВ**²

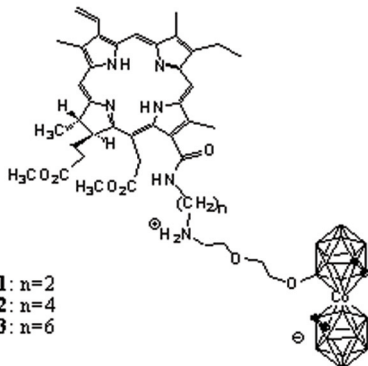
¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997, Россия;
E-mail: avfeofanov@yandex.ru; Phone: +7-495-336-64-55;

²Московская государственная академия тонкой химической технологии, Москва, 119571, Россия;

³Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, 119991, Россия

Докладываются свойства конъюгатов хлорина e₆ с бис(дикарболидом) кобальта (соединения **1-3**), полифункциональных агентов для флуоресцентной диагностики, бор-нейтрон захватной (БНЗТ) и фотодинамической (ФДТ) терапии рака. Конъюгаты **1-3** проникают и эффективно накапливаются в цитоплазме клеток аденокарциномы легкого человека A549. Для них характерно диффузное распределение в цитоплазме и концентрирование в лизосомах. Согласно результатам микроспектрального анализа конъюгаты **1-3** накапливаются в клетке в липидоподобном окружении, наиболее вероятно, в мембране лизосом и в цитоплазматических мембранных структурах. Удлинение линкера между хлорином e₆ и бис(дикарболидом) кобальта улучшает проникновение конъюгата в клетки. При 0,5 мкМ концентрации конъюгата **3** во внешней среде внутриклеточное содержание атомов бора достигает 0,5×10⁹ атомов бора на клетку, что создает необходимые условия для БНЗТ, в основе которой разрушение раковых клеток свободными радикалами, образующимися в результате ядерной реакции между тепловыми нейтронами и атомами бора.

Конъюгаты **1-3** обладают высокой фотоиндуцированной цитотоксичностью в отношении клеток A549, которая усиливается в ряду соединений **1, 2, 3**, что согласуется с возрастанием внутриклеточного накопления для этих соединений. Установлено, что без активирующего воздействия (нейтроны, свет) конъюгаты **1-3** не токсичны для клеток A549. Таким образом, соединение **3** является наиболее перспективным из исследованных конъюгатов для противоопухолевой БНЗТ и ФДТ, а также благодаря собственной флуоресценции и высокому накоплению в раковых клетках применимо для флуоресцентной диагностики рака.



КОМПОЗИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ С НАСТРАИВАЕМОМ ПЛАЗМОННЫМ РЕЗОНАНСОМ ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ
Nanocomposites with tunable plasmon resonance for biomedical applications

**Николай ХЛЕБЦОВ^{1,2}, Борис ХЛЕБЦОВ¹, Виталий ХАНАДЕЕВ¹,
Елизавета ПАНФИЛОВА¹, Георгий ТЕРЕНТЮК¹, Елена ТУЧИНА²,
Валерий ТУЧИН², Валентина РУМЯНЦЕВА³, Андрей ИВАНОВ⁴, Игорь ШИЛОВ⁵,
Анастасия РЯБОВА⁶, Виктор ЛОЦЕНОВ⁶**

¹Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, 410049, г. Саратов, Россия
E-mail: khlebtsov@ibppm.sgu.ru

²Саратовский госуниверситет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, 410012, Россия

³Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, Москва, 119571, Россия

⁴Учреждение Российской академии медицинских наук Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва, 115478, Россия

⁵Учреждение Российской академии наук Фрязинский филиал Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, Фрязино, Московская область, 141190, Россия

⁶Центр естественнонаучных исследований Института общей физики имени А.М. Прохорова РАН, 119991, Москва, Россия

Актуальной задачей нанобиотехнологии является создание многофункциональных наноструктур для тераностики, совмещающих терапевтические и диагностические свойства в одной наночастице. С этой точки зрения представляются перспективными наноструктуры, которые совмещают уникальные оптические свойства наночастиц с плазмонным резонансом и преимущества пористых частиц SiO_2 , функционализованных молекулами фотосенсибилизатора [1]. В работе получены композитные наночастицы, состоящие из золото-серебряных наноклеток, золотых нанооболочек или наностержней, покрытых мезопористой оболочкой из двуокиси кремния и функционализированных фотосенсибилизатором (ФС) (гематопорфирин, Yb-2,4-диметоксигематопорфирин, ICG). Положение плазмонного резонанса контролируется осевым отношением Au стержней, структурой и размером Au/Ag наноклеток и SiO_2/Au нанооболочек, а толщина мезопористой силикатной оболочки варьируется от 10 до 50 нм. Кроме плазмонного резонанса в области 600–900 нм, композитные наночастицы имеют дополнительный пик поглощения (соответствующий связанному ФС), характерные полосы видимой флуоресценции, способны генерировать синглетный кислород и тепловую энергию. Показана зависимость интенсивности флуоресценции композитов от расстояния между молекулами ФС и металлическим ядром, которое контролируется толщиной оболочки SiO_2 в диапазоне 5–50 нм. Наличие дополнительной полосы люминесценции иона Yb^{3+} в области 900–1100 нм использовано для контроля накопления и биораспределения конъюгатов в органах и тканях мышей с привитой карциномой Эрлиха методом ИК-люминесценции в окне прозрачности биотканей. Обсуждается также применение нанокompозитов в качестве антимикробных агентов [2].

1. Хлебцов Б. Н. и др. *Российские нанотехнологии*, 2011, 6 (3) (в печати).

2. Burygin G.L. et al., *Nanoscale Res. Lett.* 2009, 4, 794; Tuchina E.S. et al. *Quant. Electron.*, 2011, 41 (4), 354.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ЛЮМИНОФОРОВ С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

Interaction of nonorganic luminophors with serum albumin

Галина **ЧУДИНОВА**¹, Илья **НАГОВИЦЫН**^{1,2}, Владимир **КУРИЛКИН**³,
Алексей **НИКИТИН**^{4,3}

¹Центр естественно-научных исследований Института общей физики им. А. М. Прохорова РАН, ул. Вавилова, д. 38, Москва, 119991, Россия; E-mail: galkon@list.ru; Phone: +7-499-503-81-77;

²Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, ул. Косыгина, д. 4, Москва, 119991, Россия;

³Российский Университет дружбы народов, ул. Миклухо-Маклая, д.6, 117198, Москва, Россия;

⁴Научно-технологический центр уникального приборостроения РАН, ул. Бултерова, д.15, оф.436, 117342, Москва, Россия;

Получены стабильные растворы комплексов сывoroточного альбумина человека (ЧСА) (Sigma) и новых соединений редкоземельных элементов $Y_{0,95}Er_{0,05}VO_4$ и $Y_{0,95}Er_{0,05}VO_3Cl$ обработкой ультразвуком в водных растворах 100 мМ NaCl. Навески соединений РЗЭ из расчета 0,6 мг/мл в растворе ЧСА 10^{-5} М обрабатывали ультразвуком на установке Branson 1510 в течение 40 мин, выдерживали сутки, отфильтровывали. Оптические свойства комплексов исследовали методами абсорбционной (спектрофотометр Shimadzu UV-1800, Япония) и флуоресцентной спектроскопии (спектрофлуориметр Shimadzu RF-5301, Япония) в растворах с концентрацией ЧСА 10^{-6} М. Комплексы ЧСА- $Y_{0,95}Er_{0,05}VO_4$ (КС-1) и ЧСА- $Y_{0,95}Er_{0,05}VO_3Cl$ (КС-2) имеют полосы флуоресценции с максимумами при 526, 547 и 555 нм ($\lambda_{ex} = 300$ нм). По-видимому, хлор является тушителем, т.к. интенсивность флуоресценции КС-1 превышает таковую для КС-2 приблизительно в 4 раза. Так, интенсивность флуоресценции при 526, 547, 555 нм для КС-1 составляет 212, 111, 236 отн. ед. соответственно, а для КС-2 - 49, 28, 64 отн. ед. При возбуждении светом с длиной волны 280 нм наблюдали усиление белковой флуоресценции ($\lambda_{em} = 339$ нм) в КС-1 и КС-2 в 6 и 1,5 раза по сравнению с раствором ЧСА 10^{-6} М. При $\lambda_{ex} = 300$ нм флуоресценция белка в комплексах КС-1 и КС-2 увеличивается в 8 и 2,4 раза по сравнению с раствором ЧСА. Свойства комплексов контролировали на спектрометре динамического рассеяния Photocor Complex (США). Полученные комплексы планируется использовать для исследования иммунологических реакций и для исследований переноса энергии в модельных пигмент-белковых комплексах.

Коллектив благодарит А. Рябову (ЦЕНИ ИОФ РАН) за помощь в работе. Работа поддержана проектом МНТЦ № 3910.

ОПТИЧЕСКАЯ ИНТРОСКОПИЯ В ПЛАНИРОВАНИИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ Optical introscopy in planning of PDT

Наталья ШАХОВА¹, Ольга КАЧАЛИНА², Ирина КУЗНЕЦОВА³, Дарья БУНДИНА²

¹Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород, 603950, Россия
shakh@ufr.appl.sci-nnov.ru; тел. +7-831-4368010; факс 7-831-4363792

² ГОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия»

³ ГУЗ Областная клиническая больница

Неопластические процессы шейки матки – актуальная медицинская и социальная проблема. Рак шейки матки (РШМ) занимает 2 место по частоте и 3-е место по смертности среди злокачественных новообразований репродуктивной системы женщин [1-4]. Одним из направлений профилактики РШМ является адекватное лечение цервикальных интраэпителиальных неоплазий (ЦИН) [2, 4]. Учитывая тенденции последнего десятилетия к омоложению ЦИН и РШМ, особую актуальность приобретают точная своевременная диагностика и органосохраняющие методы лечения указанных состояний.

ФДТ является методом выбора лечения ЦИН и раннего РШМ у женщин репродуктивного возраста, что обусловлено достаточной эффективностью метода при максимальной органосохранности. Для проведения ФДТ необходимо точное стадирование неоплазии. Однако, «золотой стандарт» диагностики ЦИН и РМШ (кольпоскопия (КС) и прицельная биопсия) и обладает недостаточной чувствительностью и специфичностью для выявления ЦИН [5]. Для компенсации указанных недостатков предлагают использовать мультифокусные рандомные биопсии либо лечебно-диагностические эксцизии. Альтернативой данной тактики может стать совместное использование КС и новых неинвазивных диагностических технологий. В нашей работе в группе пациенток репродуктивного возраста с подозрением на ранние формы неоплазии шейки матки мы используем оптическую интроскопию на базе оптической когерентной томографии (ОКТ).

В результате разработан диагностический протокол, включающий кольпоскопию, ОКТ и биопсию. ОКТ данные позволяют:

на этапе первичной диагностики отказаться от рандомных биопсий;

на этапе уточняющей диагностики отказаться от широких эксцизий в пользу ФДТ;

на этапе наблюдения после лечения неинвазивно оценить своевременность и адекватность процессов заживления. В отдаленном периоде ОКТ данные могут быть использованы для ранней диагностики рецидивов.

По нашему мнению разработанный диагностический алгоритм будет способствовать эффективной профилактике рака шейки матки при сохраненной репродуктивной функции.

1. Клиническая онкогинекология / М.: Медицина, 2005.- 373с.

2. Минкина Г.М., Манухин И.Б., Франк Г.А. Предрак шейки матки. – М.: Аэрограф-медиа, 2001. - 118 с

3. NHO Weekly epidemiological record, 15, 2009, p.116-132

4. Ronco G, Rossi P. New paradigms in cervical cancer prevention: opportunities and risks. BMC Women's Health. 2008;8:23

5. Ferris DG, Litaker MS, ALTS Group. Prediction of cervical histologic results using an abbreviated Reid Colposcopic Index during ALTS. Am J Obstet Gynecol 2006;194:704–10

ИЗУЧЕНИЕ ФОТОИНДУЦИРОВАННОГО ГЕМОЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БРИЛЛИАНТОВОГО ЗЕЛЕННОГО

Study of photoinduced hemolysis with using Brilliant Green

Ирина ЯНИНА¹, Александр ПРАВДИН¹, Валерий ТУЧИН^{1,2,3}

¹Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, 410012, Россия E-mail: irina-yanina@yandex.ru; Fax: +7-8452-27-85-29

²Институт проблем точной механики и управления РАН, Саратов, 410028, Россия

³FiDiPro Project, University of Oulu, Finland

Основной ярко-зеленый – трифенилметановый краситель, содержащий аминные или замещенные аминные группы в бензольном кольце. Его химическая формула – $C_{27}H_{33}N_3ClBr$ [1, 2]. Красители трифенилметанового ряда широко применяют в аналитической химии, фотохимии и др. областях [1]. Он обладает бактерицидными свойствами и в виде спиртового раствора под названием «бриллиантовый зеленый» применяется как антисептическое средство при мелких повреждениях кожи, гнойно-воспалительных заболеваниях кожи – пиодермиях, фурункулах, при лечении гнойных ран, язв и ожогов; при блефарите. Иногда находит применение для обработки операционного поля, а также кожных покровов после операций и травм. Оказывает противомикробное действие без повышения внутриклеточного давления, чем отличается от раствора йода [3].

При анализе литературы выяснилось, что бриллиантовый зеленый не относят к фотодинамическим красителям. Однако в работах [4, 5] обнаружена его фототоксичность при резонансном возбуждении светодиодным излучением в полосы поглощения.

Целью работы явилось установление фототоксических свойств трифенилметанового красителя бриллиантового зеленого путем проведения экспериментов по фотоиндуцированному гемолизу.

Наиболее простым и наглядным способом подтверждения факта, что бриллиантовый зеленый можно отнести к фотодинамическим красителям является изучение фотоиндуцированного гемолиза. Одним из возможных механизмов фототоксичности этого красителя может быть фотодинамическое воздействие на клетки, при котором генерируется синглетный кислород. Считают, что основной мишенью при фотодинамическом поражении клеток являются ее мембраны, нарушение функции которых вызывает снижение жизнеспособности и гибель клетки. Удобным объектом для наблюдения фотодинамического действия на плазматическую мембрану являются эритроциты. О повреждении мембраны можно судить, наблюдая гемолиз – разрушение эритроцитов, сопровождающееся выходом гемоглобина из клеток. За процессом гемолиза наблюдают, используя метод фотометрии.

В экспериментах использовали 10% суспензию эритроцитов. Бриллиантовый зеленый, растворенный в физиологическом растворе (0,2 г/л). Диодный лазер, 635 нм. Плотность мощности, 200 мВт/см². Длительность облучения 5 мин.

В результате экспериментов наблюдалось снижение оптической плотности раствора суспензии эритроцитов, окрашенных бриллиантовым зеленым и облученных лазерным излучением, что может свидетельствовать о наличии фотодинамических свойств у данного красителя. Однако для установления преобладающего механизма фототоксичности красителя необходимы дополнительные исследования с принудительным тушением синглетного кислорода или фотореакции с образованием токсических продуктов.

1. Степанов Б.И. Введение в химию и технологию органических красителей. М.: Химия, 1977. С.142–143

2. Мчедлов-Петросян Н.О., *Теоретическая и экспериментальная химия*, 1990, 26(6), 688–698

3. Niedner R., and Sc̈opf E., *British Journal of Dermatology*, 2006, 115(31), 41–44

4. Tuchin V.V., Altshuler G.B., Yanina I.Yu., Kochubey V.I., Simonenko G.V., *Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics VII, Proc. SPIE*, 2010, 7563-30

5. Дубровский Б.А., Дворкин Б.А., Тучин В.В., Янина И.Ю., *Цитология*, 2011, 53(5), 423–432

Авторский указатель

Symbols

- АБАТУРОВА 65
АБОЛТИН 79
АБРАМЧИК 55
АВЕРЧЕВА 39
АКИМКИН 149, 192
АКИНЧИЦ 157, 177
АКСЕНОВА 173
АКЧУРИН 97, 150
АЛБЕГОВА 117
АЛЕКСАНДРОВА 115
АЛЕНИНА 164
АЛИЕВ 48
АЛИЕВА 154
АНТАЛ 40
АНТИПИНА 194
АНТОНЕНКО 151, 167
АРТЕМЬЕМ 162
АРТЮХОВ 98, 107, 140
АРХИПОВА 115
АСТАПОВА 195
АШИХМИН 9
БАВРИНА 124
БАГРАТАШВИЛИ 152
БАЙКОВ 41
БАЙРАМОВА 42
БАЛАЛАЕВА 153, 155, 157, 165
БАЛАШОВ 90
БАРАТОВА 27
БАРБАШОВ 109
БАССАРСКАЯ 39
БАЧУРИНА 93
БЕЗДЕТНАЯ 131
БЕЗРУКИХ 99
БЕЛОГУРОВА 154
БЕЛОЗЕРСКАЯ 80
БЕЛОУС 43
БЕЛЯЕВА 86
БЕРЕЖНАЯ 132
БЕХАЛО 145
БИБОВ 112
БОЛТАЕВ 100, 173, 184
БОЛЫЧЕВЦЕВА 44, 49
БОЛЬШАКОВ 9, 10
БОНДАРЬ 130
БОРАЗНОВСКАЯ 128
БОРИСЕВИЧ 13, 118
БРАТАШОВ 150
БРЕГАДЗЕ 195
БРИЛКИНА 153, 155, 161
БРЯНЦЕВА 101
БУГЛАК 81, 88, 102
БУГРОВА 161
БУДЫНИНА 103
БУНДИНА 198
БУРАКОВА 106, 156
БЫКОВА 39
ВАСИЛЬЕВА 11, 18, 30
ВАСЬКОВА 119
ВАСЮТИНСКИЙ 104
ВДОВИНА 98
ВЕКШИН 105
ВЕРШИНИН 187
ВЕЧТОМОВА 81, 92, 102
ВИНОКУРОВ 133
ВЛАСОВА 117
ВОДЕНЕЕВ 71, 157, 177
ВОЙЦЕХОВСКАЯ 45, 73
ВОЛГУШЕВА 40
ВОЛНУХИН 172
ВУСОВИЧ 187
ВЫСОЦКИЙ 106, 121, 156, 194
ГАБДУЛХАКОВ 30
ГАДИРОВ 101
ГАДИСОВА 89

ГАЛИЕВСКИЙ 189, 190
ГАНЦЕВ 191
ГАПЕЕВ 143
ГАРАЗД 101
ГАРРЪЕ 131
ГЕРАСИМОВА 170, 175
ГЕССЛЕР 80
ГИЛИЧИНСКИЙ 90
ГИТЕЛЬЗОН 130
ГЛАГОЛЕВ 173
ГЛАЗУНОВА 46
ГОЛОВКО 47, 51
ГОЛУБЯТНИКОВ 176, 183
ГОЛЬБЕК 25
ГОРИН 97, 150
ГОСТЕВ 25, 34
ГРАЧЕВ 65
ГРИБКОВ 177
ГРИГОРЬЕВ 165
ГРИН 195
ГУДКОВ 143
ГУЛЬНОВ 175
ГУСЕЙНОВА 48, 67, 70
ДАЛЬКЭ 47, 51
ДАНИЛЬЧЕНКО 109
ДЕГТЯРЕВА 29
ДЕЕВ 153
ДЕМЧУК 83
ДЕМЬЯНЕНКО 112
ДЕРЯБИНА 80
ДЕРЯГИН 159
ДЖАГАРОВ 158
ДОЛГИХ 90
ДОНЦОВ 82, 134
ДРУЖИНИН 124
ДУБАСОВА 155
ДУБОВА 107
ДЫМОВА 47
ДЪЯКОНОВА 65
ДЮДЕЛЕВ 159
ЕЛАГИН 161
ЕЛАНСКАЯ 44, 49, 56
ЕРЕМЕЕВ 106
ЕРМОЛАЕВА 145
ЕСИМБЕКОВА 99, 108, 120
ЕФИМОВА 50
ЕФРЕМЕНКО 164, 195
ЖАРНИКОВА 160
ЖЕЛНИНСКАЯ 73
ЖЕРДЕВА 122, 171
ЖИГАЛОВА 39, 69
ЖИЕНТАЕВ 100, 173
ЗАБЕЛИН 12
ЗАГАЙНОВА 161, 165, 171
ЗАГИДУЛЛИН 13
ЗАК 83
ЗАЛЕССКИЙ 109
ЗАХАРОВА 143
ЗАХОЖИЙ 47, 51
ЗОБОВА 14, 27
ЗОЛОТАРЁВА 52, 60
ЗОРИН 131, 162
ЗОРИНА 162
ЗУЗА 62
ЗЮЗЬКОВА 128
ИВАНИЦКИЙ 84
ИВАНОВ 32, 53, 54, 58, 59, 66, 74,
173, 196
ИВАНОВА 73, 103, 176, 183
ИВАШИНА 133
ИВЛЕВ 84
ИГЛАКОВА 181
ИГНАТОВА 54, 66, 74, 110, 195
ИНОЗЕМЦЕВА 193
ИСАКОВА 80
ИСМАЙЛОВ 163, 164
КАБАШНИКОВА 55
КАЗАЧКИНА 122
КАЛАМКАРОВ 79
КАМЕНСКИЙ 176, 183

КАРАПЕТЯН 44, 56, 75
КАРЕТНИКОВА 187
КАРНАЧУК 50
КАТИЧЕВ 155
КАЧАЛИНА 198
КАШИН 192
КАШИРИНА 46
КВИТКА 41
КИРИЛЛОВА 170
КИРПИЧНИКОВ 90
КИСЕЛЕВСКИЙ 57
КЛАПШИНА 165
КЛЕНИНА 15, 58
КЛИМОВ 23, 28, 32
КНЯЗЕВА 65, 113
КОВАЛЕВА 112, 132
КОВАЛЕНКО 65
КОВАЛИК 129
КОЖИНОВА 126
КОЗЛОВ 166, 169
КОЗУЛЕВА 53, 58
КОЗЫРЬ 117
КОКШАРОВ 111, 135
КОЛЕСНИКОВ 92
КОЛЕСНИКОВА 97
КОЛОСОВ 112
КОЛЧЕВ 84
КОМАНДИРОВ 113
КОМИССАРОВ 16, 85
КОППЕЛЬ 86
КОРОМЫСЛОВА 82
КОТОВА 167
КОЧЕТОВА 86
КРАВЦОВ 50
КРАВЧЕНКО 162
КРАЙСКИЙ 168, 180
КРАСНОВСКИЙ 21, 166, 169
КРАТАСЮК 99, 108, 114, 120, 175
КРИЦКИЙ 87, 102
КРУТОВА 153
КРЮКОВА 90
КУДРЯШЕВА 115, 139, 154, 170
КУЗЕВАНОВ 167
КУЗНЕЦОВ 50
КУЗНЕЦОВА 198
КУЗЬМИН 172
КУЗЬМИНОВ 56
КУИМОВА 116
КУЛАГИНА 186
КУРАШОВ 17, 19, 22
КУРИЛКИН 197
КУЦ 164
КУЧИНСКИЙ 159
КЯГОВА 117, 126
ЛАДИЛИНА 165
ЛАЗУКИН 124
ЛАПАШИНА 151
ЛАПШИН 133
ЛЕВИН 79
ЛЕВОВ 134
ЛЕКАНОВА 153, 165
ЛЕОНОВА 11, 18, 31
ЛЕПЕШКЕВИЧ 158, 160
ЛЕРМОНТОВА 165
ЛИДОХОВА 140
ЛОБАНОВ 16
ЛОГАЦКАЯ 162
ЛОГИНОВА (САЛЫКИНА) 171
ЛОЗНИКОВА 118
ЛОМАКИНА 119, 123
ЛОНШАКОВА 120
ЛОСЕВ 159
ЛОЩЕНОВ 196
ЛУКАШЕВ 27, 49, 90
ЛУКЪЯНЕЦ 110
ЛУПАНОВА 136
ЛЫГО 172
ЛЮБИЦКИЙ 169
ЛЮДНИКОВА 88, 102
МАЗАЛЕЦКАЯ 172

МАКСИМОВ 13, 97, 109
МАКСИМОВА 193
МАЛАХОВ 126
МАЛЕХАНОВА 153
МАЛИКОВА 106, 156
МАЛИНГРИО 186
МАЛИНОВСКАЯ 124
МАМЕДОВ 17, 19, 22, 25, 34
МАНОХИН 143
МАРКОВА 106, 121
МАРТЫНОВ 179
МАСЛЕННИКОВА 176, 183
МАСЛОВА 110
МАТВИЕНКО 181
МАХНЕВА 9, 10, 15
МЕДВЕДЕВА 130
МЕЕРОВИЧ 122
МЕЛИК-НУБАРОВ 100, 173, 184
МЕЛЬНИКОВ 103
МЕРЗЛЯК 188
МИЛАНОВСКИЙ 20
МИНИЧ 84
МИРОНОВ 195
МИРОНОВА 168
МОДЕСТОВА 123
МОНИЧ 124
МОСКАЛЕНКО 9, 10, 15
МУБАРАКШИНА 53, 59
МУРАШЕВ 143
МУРОНЕЦ 49
МЬСЯГИН 71, 165
НАГОВИЦЫН 85, 197
НАГУРСКАЯ 145
НАДТОЧЕНКО 25, 34, 125, 161
НАЙДОВ 53, 59
НАКВАСИНА 140
НАСРУЛЛАЕВА 67
НАЩЕКИН 174
НЕВЕДОМСКИЙ 174
НЕВЕРОВ 21
НЕГРИМОВСКИЙ 110
НЕКИПЕЛОВА 172
НЕМЦЕВА 170, 175
НЕРУШ 71, 157
НЕЧАЕВ 187
НИКИТИН 197
НОВОДЕРЕЖКИН 14
НОВОСЕЛЕЦКИЙ 90
ОБРАЗЦОВ 174
ОВЧИННИКОВ 194
ОКАНЕНКО 72
ОМАРОВА 89
ОНОЙКО 60
ОНУФРИЕВ 93
ОПАНАСЕНКО 61
ОРЛОВА 157, 176, 177, 183
ОСИПОВ 169
ОСТАХОВ 191
ОСТРОВСКИЙ 83, 134, 178
ОШЛАКОВ 181
ПАВЛОВА 117
ПАНОВА 178, 192
ПАНФИЛОВА 196
ПАРХОЦ 160
ПАСКЕВИЧ 143
ПАХОМОВ 179
ПАЩЕНКО 13
ПЕРЕВОЩИКОВА 186
ПЕРЕГУД 93
ПЕРМЯКОВА 84
ПЕТРОВА 17, 19, 22
ПЕТРОВСКАЯ 90
ПИГОЛЕВ 23
ПЛЕХАНОВ 176, 183
ПОГОДИНА 83
ПОГРОМСКАЯ 62, 63
ПОДОРВАНОВ 64
ПОДСВИРОВ 174
ПОЛИЩУК 64
ПОЛТАВЦЕВА 178

ПОЛЬ 186
ПОПОВ 41
ПОРТНОВ 97, 150
ПОСТНИКОВ 168, 180
ПОТАПЕНКО 117, 126, 145
ПРАВДИН 199
ПРОКОПЬЕВ 127, 128, 129, 181
ПРОНКИН 182
ПРОСКУРЯКОВ 15, 24, 58
ПРЯНИКОВА 176, 183
ПТУШЕНКО 39
ПУЗЫРЬ 130
ПУРТОВ 130
ПУТИНЦЕВА 98, 107
ПШИБЫТКО 55
ПЯТНИЦКИЙ 117
РАДЦИГ 125
РАФАИЛОВ 159
РАХИМБЕРДИЕВА 56
РЕШЕТОВ 109, 131, 162
РИЗНИЧЕНКО 65
РОДИЧЕВА 130
РОЖКО 115
РОЗЕНКРАНЦ 136
РОМАНОВА 143
РОМАНЮК 184
РУБИН 65, 90, 138
РУДЕНКО 54, 66, 74
РУДКОВСКИЙ 113, 132
РУМБАЛЬ 166
РУМЯНЦЕВА 196
РУСАНОВ 133
РУСТАМОВА 48, 67
РЫКТОР 63
РЯБОВА 196
САБУРОВА 186
САВИЦКИЙ 122, 133, 171
САВЧЕНКО 55
САКИНА 82, 134
САМУИЛОВ 57
САНТАБАРБАРА 21
САНТАЛОВА 143
САРКИСОВ 25, 34, 109, 144
СВЕТЛОВА 72
СВИРИДОВ 81
СВИРИДОВА-ЧАЙЛАХЯН 143
СЕЛИВАНОВ 129
СЕМЁНОВ 17
СЕМЕНОВ 19, 20, 22, 25, 34
СЕМЕНОВА 66
СЕРГЕЕВА 155, 161, 177
СИББЕТ 159
СИВАЕВ 195
СИДОРОВ 174
СИЗОВ 124
СИМОНОВА 143
СИНЕЩЕКОВ 86
СИНЬКО 16
СИРОТКИНА 161
СЛАСТНИКОВА 136
СМИРНОВ 16
СМИРНОВА 135
СМОЛИН 104
СНОПОВА 161, 176
СОБОЛЕВ 136
СОКОЛОВ 186
СОКОЛОВА 101, 187
СОКОЛОВСКИЙ 159
СОЛНЦЕВ 41
СОЛОВЧЕНКО 188
СОЛОВЬЕВА 100, 173
СОФРОНОВА 68
СПИРИНА 90
СТАШЕВСКИЙ 131, 189, 190
СТОЛБОВСКАЯ 137
СТОЛОВИЦКИЙ 26
СТОРОЖЕНКО 72
СТРАХОВСКАЯ 138
СТРИЖ 69, 91
СТРИКОВСКИЙ 161

СУЛЕЙМАНОВ 67
СУЛТАНБАЕВ 191
СУЛТАНОВ 168, 180
СУЛТАНОВА 70
СУНЬ 188
СУХИХ 178
СУХОВ 71, 157
СУХОДОЛА 118
СУХОРУКОВ 97
СЫСОЛЯТИНА 145
СЫЧЕВ 90
ТАИСОВА 14, 27
ТАРАН 72
ТАРАСОВА 139
ТАТИКОЛОВ 149, 178, 182, 192
ТЕЛЕГИНА 81, 88, 92, 102
ТЕРЕНТЬЕВ 28
ТЕРЕНТЮК 193, 196
ТЕРЕХОВА 75
ТЕРПУГОВ 29
ТИМОФЕЕВ 49
ТИМОШЕВСКИЙ 23
ТИХОМИРОВ 126
ТИХОНОВ 41
ТОМИЛИН 194
ТОПОРОВА 49
ТОПЧИЙ 64
ТРУБИЦЫНА 140
ТРУШКОВ 103
ТУРОВЕРОВ 174
ТУРЧИН 133, 176, 183
ТУЧИН 196, 199
ТУЧИНА 196
ТЮТЕРЕВА 73
УГАРОВА 111, 119, 123, 135, 141
УДУТ 127, 128, 129
УЗДЕНСКИЙ 112, 113, 132, 142
УСОВ 174
УСТИНИН 65
ФАХРАНУРОВА 143
ФЕДОРЕНКО 113
ФЕДОРОВА 27
ФЕДОРЧУК 54, 66, 74
ФЕЛЬДМАН 178
ФЕОФАНОВ 110, 195
ФЕТИСОВА 14, 27
ФИЛИППОВИЧ 93
ФРАЙКИН 94
ФУФИНА 11, 30
ХАЙРУЛЛИН 137
ХАНАДЕЕВ 196
ХАТЫПОВ 11, 18, 30, 31
ХИЛЯ 101
ХЛЕБЦОВ 97, 193, 196
ХМЕЛЬ 125
ХМЕЛЬНИЦКАЯ 30
ХМЕЛЬНИЦКИЙ 18, 31
ХОДОТ 172
ХОМУТОВ 97
ХОРОБРЫХ 32, 53
ХРАМОВ 143
ХРИПАЧ 50
ХРИСТИН 31, 33
ХРУЩЕВ 65
ХУРСАН 191
ЧАЙКОВСКАЯ 187
ЧЕРЕПАНОВ 20
ЧИВКУНОВА 188
ЧУДИНОВА 197
ШАХБАЗЯН 144
ШАХОВА 155, 176, 198
ШЕВЧЕНКО 79, 168
ШЕЛАЕВ 25, 34
ШИЛОВ 196
ШИРМАНОВА 161, 165, 171
ШКУРОПАТОВ 12, 28
ШКУРОПАТОВА 12, 28
ШМИГОЛЬ 126, 145
ШТЕРНИН 104
ШУБИН 75

ШУВАЛОВ 11, 12, 18, 25, 28, 30, 31, **R**
34, 35
ШУМАЕВ 79
ЩЕРБИН 118
ЯКОВЛЕВ 14, 35
ЯКОВЛЕВА 178
ЯНИН 161
ЯНИНА 199
ЯНЫКИН 32
ЯРМОЛЮК 149, 192

B
BAGDONAS 185

D
DAMALAKIENE 185
DENICKE 104
DONNER 83

G
GERICKE 104
GURUPRASAD 86

J
JUZENIENE 142

K
KARABANOVAS 185
KARMENYAN 144
KRIVOKHARCHENKO 144

L
LINDSTRÖM 83

M
MANO 32
MOAN 142

REUMANN 45
ROTOMSKIS 185

S
STRZALKA 55

V
VALIUS 185

W
WELLER 86

Содержание

Обращение к участникам	3
Секция 1. ПЕРВИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ	
ФОТОСИНТЕЗА	7
Секция 2. РЕГУЛЯЦИЯ ФОТОСИНТЕЗА.....	37
Секция 3. ФОТОРЕЦЕПТОРЫ	77
Секция 4. БИОМЕДИЦИНСКИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ	
ФОТОФИЗИКИ И ФОТОХИМИИ	95
Секция 5. БИОФОТОНИКА	147
Авторский указатель	200

Научное издание

VI Съезд

Российского фотобиологического общества

пос. Шепси, 15–22 сентября 2011 г.

Материалы съезда

Подписано в печать 23.08.11

Бумага офсетная № 1

Условных печ. л. – 13,0

Формат 60 x 90 1/16

Зак б/н

Тираж 250 экз.

Издательско-полиграфический комплекс НИА-Природа

119017, Москва, Старомонетный пер., 31.

Тел./факс: 951-28-12.

