



**VIII Съезд
Российского фотобиологического общества**

**Всероссийская конференция
“Современные проблемы фотобиологии”**

пос. Шепси, 10–15 сентября 2017 г.

Материалы съезда

Пушино 2017

Российское фотобиологическое общество
Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт фундаментальных проблем биологии
Российской академии наук

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

пос. Шепси, 10–15 сентября 2017 г.

Материалы съезда

Пушино – 2017

VIII Съезд Российского фотобиологического общества.

Материалы съезда.

ред. И. И. Проскуряков, И. А. Найдов.

г. Пущино, Россия 2017, 152 стр.

ISBN 978-5-9905822-3-1

ОБРАЩЕНИЕ К УЧАСТНИКАМ

Дорогие друзья!

Мы рады приветствовать вас на VIII съезде Российского фотобиологического общества, который проводится в пансионате «Маяк», пос. Шепси Краснодарского края. В рамках съезда проводится всероссийская конференция «Современные проблемы фотобиологии». Съезд и конференция проводятся при поддержке Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук» и Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова».

Программа съезда и конференции включает следующие секции:

1. Первичные процессы фотосинтеза
(организаторы: Проскуряков И. И., Семенов А. Ю.)
2. Регуляция фотосинтеза (организатор: Иванов Б. Н.)
3. Фоторецепция (организаторы: Коппель Л. А., Петровская Л. Е.)
4. Фундаментальные основы фотомедицины
(организаторы: Грин М. А., Красновский А. А., Филоненко Е. В.)
5. Биофотоника молекул и наночастиц
(организаторы: Баграташвили В. Н., Надточенко В. А., Тучин В. В.)
6. Биолюминесценция и фотоника флуоресцентных белков
(организаторы: Высоцкий Е. С., Исмаилов А. Д.)
7. Микроводоросли как преобразователи солнечной энергии в биотоплива и ценные продукты (организаторы: Соловченко А. Е., Цыганков А. А.)

На нашей встрече предстоит заслушать около 130 научных докладов участников, представляющих 11 регионов и 6 субъектов Российской Федерации. Среди них 36 докторов наук и 56 кандидатов наук.

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

Нам предстоит также принять современный Устав общества.

Мы приветствуем вас на Съезде и надеемся, что научные дискуссии окажутся плодотворными, молодые ученые представят конкурентные работы высокого уровня, и мы сможем утвердить Устав общества.

От имени Оргкомитета съезда,

Президент Российского фотобиологического общества,
А. А. Цыганков

Вице-президент Российского фотобиологического общества,
А. Ю. Семенов

ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ

Сопредседатели

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

А. А. Цыганков – Институт фундаментальных проблем биологии РАН (ИФПБ РАН), Пущино

Заместители председателя оргкомитета

М. Д. Мамедов – НИИФХБ МГУ, Москва

Е. А. Котова – НИИФХБ МГУ, Москва

Ученый секретарь

Л. А. Коппель – Биологический факультет МГУ им. Ломоносова, Москва

Члены Оргкомитета

С. И. Аллахвердиев – Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва

В. Н. Баграташвили – Институт проблем лазерных и информационных технологий (ИПЛИТ РАН), Троицк

Е. С. Высоцкий – Институт биофизики СО РАН, Красноярск

М. А. Грин – Московский технологический университет, Москва

Б. Н. Иванов – ИФПБ РАН, Пущино

А. Д. Исмаилов – Биологический факультет МГУ, Москва

А. А. Красновский – ФИЦ “Биотехнология” РАН (Институт биохимии им. А. Н. Баха), Москва

В. А. Надточенко – Институт проблем химической физики РАН, Москва

И. А. Найдов – ИФПБ РАН, Пущино

Л. Е. Петровская – ИБХ им. академиков М. М. Шемякина и

Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

И. И. Проскураков – ИФПБ РАН, Пущино

В. В. Тучин – Физический факультет СГУ им. Чернышевского, Саратов

А. Е. Соловченко – Биологический факультет МГУ

Л. Г. Васильева – ИФПБ РАН, Пущино

И. Г. Стерелюхина – ИФПБ РАН, Пущино

Е. В. Филоненко – МНИОИ им. П. А. Герцена, Москва

ПРОГРАММА КОНФЕРЕНЦИИ

ПОНЕДЕЛЬНИК, 11 СЕНТЯБРЯ

8:30–9:00. РЕГИСТРАЦИЯ

9:00–9:15. ОТКРЫТИЕ СЪЕЗДА, ВЫБОРЫ КОНКУРСНОЙ КОМИССИИ ПО ОЦЕНКЕ РАБОТ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

СЕКЦИЯ 4. ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ ФОТОМЕДИЦИНЫ

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели: А. Ю. Семенов, А. А. Цыганков

9:15–9:45 **Филоненко Елена Вячеславовна.** Выбор фотосенсибилизатора для клинической фотодинамической терапии

9:45–10:15 **Странадко Евгений Филиппович.** Фотодинамическая терапия рака. Четверть века в России

10:15–10:45 **Красновский Александр Александрович.** Исследование фоторецепторных свойств кислородных молекул

10:45–11:15 **Грин Михаил Александрович.** Природные хлорофиллы: химические превращения и биомедицинское применение

11:15–11:30. КОФЕ-БРЕЙК

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели: М. А. Грин, Е. В. Филоненко

11:30–11:45 **Мионов Андрей Федорович.** Разработка тераностиков для ФДТ рака на основе природных бактериохлоринов и красителей с интенсивной флуоресценцией

11:45–12:00 **Пурцхванидзе Виолетта Александровна.** Фотодинамический фактор некроза опухолей

12:00–12:15 **Самцов Михаил Петрович.** Оптимизация условий регистрации концентрации нового ИК фотосенсибилизатора для ФДТ в тканях с помощью диффузионного флуоресцентного томографа

12:15–12:30 **Семенова Ирина Владимировна.** Динамика импульсного лазерного возбуждения фотосенсибилизатора Радахлорин и генерации синглетного кислорода с высоким временным разрешением

12:30–12:45 **Соколов Валерий Сергеевич.** Фотодинамические процессы в бислоидной липидной мембране: распределение кислорода и эффективность фотосенсибилизаторов

13:00 – 15:00. ПЕРЕРЫВ НА ОБЕД. РАЗМЕЩЕНИЕ СТЕНДОВ.
ОБСУЖДЕНИЕ СТЕНДОВЫХ ДОКЛАДОВ БУДЕТ ПРОХОДИТЬ 14 СЕНТЯБРЯ
в 17:15

Председатели: А. А. Красновский, Е. Ф. Странадко

15:00–15:15 **Феофанов Алексей Валерьевич.** Аминоалкиламидные производные хлорина е6 как фотосенсибилизаторы и переносчики наночастиц бора

15:15–15:30 **Ковалева Анастасия Алексеевна.** Фотодинамическая инактивация дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в присутствии хлорина е6 или его конъюгата с монокарбораном

15:30–15:45 **Баврина Анна Петровна.** Влияние низкоинтенсивного света на активность глутатионтрансферазы в эксперименте

15:45–16:00 **Белашов Андрей Владимирович.** Применение цифровой голографической микроскопии для мониторинга морфологических изменений клеток, вызванных фотодинамическим воздействием

16:00–16:15. КОФЕ-БРЕЙК

19:00. ФУРШЕТ

ВТОРНИК, 12 СЕНТЯБРЯ

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ (КОНФЕРЕНЦ-ЗАЛ)

Председатели: В. А. Надточенко, Б. Н. Иванов

9:00–9:35 **Васютинский Олег Святославович.** Многофотонная фемтосекундная лазерная спектроскопия молекулярных зондов

9:35–10:10 **Булычев Александр Александрович.** Регуляция фотосинтеза при участии потока цитоплазмы

10:10–10:45 **Айбуш Арсений Валериевич.** Быстрая характеристика биологических объектов методами широкополосной фемтосекундной рамановской микроспектроскопии

10:45–11:20 **Козулева Марина Алексеевна.** Влияние наличия молекулярного кислорода в атмосфере на эволюцию фотосистемы I

11:20–11:40. КОФЕ-БРЕЙК

СЕКЦИЯ 5. БИОФОТОНИКА МОЛЕКУЛ И НАНОЧАСТИЦ (КОНФЕРЕНЦ-ЗАЛ)

Председатель: А. И. Шушин

11:40–12:00 **Феофанов Алексей Валерьевич.** Взаимодействия фермента PARP1 с нуклеосомными наночастицами: исследования методом флуоресцентной микроскопии одиночных молекул и их комплексов

12:00–12:20 **Осыченко Алина Анатольевна.** Возможности лазерной нанохирургии для работы с биологическими объектами

12:20–12:40 **Антоненко Юрий Николаевич.** Применение флуоресцентной корреляционной спектроскопии для изучения накопления флуорофоров в митохондриях и клетках бактерий

12:40–13:00 **Скапцов Александр Александрович.** Люминесцентный метод контроля роста квантовых точек CuInS₂ в режиме реального времени

13:00 – 15:00. ПЕРЕРЫВ НА ОБЕД.

Председатели: О. С. Васютинский, В. А. Надточенко

15:00–15:20 **Шушин Анатолий Иванович.** Кинетика спада флуоресценции в органических полупроводниках. Эффект миграции возбуждения

15:20–15:40 **Надточенко Виктор Андреевич.** Квантовые точки в применении к биологии. Динамика экситонов и носителей заряда в квантовых точках, допированных ионами переходных металлов

15:40–16:00 **Козлова Екатерина Алексеевна.** Создание, оптические свойства и применение фантомов биологических тканей

16:00–16:20 **Волкова Елена Константиновна.** Апконверсионные наночастицы для регистрации температуры

16:20–16:40 **Янина Ирина Юрьевна.** Бесконтактное определение внутренней температуры биологических тканей по флуоресценции ап-конверсионных частиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$

16:40–17:00 **Малахов Михаил Валентинович.** Цис/транс фотоизомеризация и спектральные свойства фурукумариновой кислоты

17:00–17:15. КОФЕ-БРЕЙК

17:15–18:30. ОБСУЖДЕНИЕ СТЕНДОВЫХ ДОКЛАДОВ

СЕКЦИЯ 2. РЕГУЛЯЦИЯ ФОТОСИНТЕЗА (*Музыкальный зал*)

Председатели: А. А. Булычев, Е. В. Тютерева

11:40–12:00 **Сухов Владимир Сергеевич.** Электрические сигналы как механизм регуляции процессов фотосинтеза и дыхания

12:00–12:20 **Ветошкина Дарья Васильевна.** Исследование state transitions в листьях высших растений с помощью различных подходов

12:20–12:40 **Тютерева Елена Владимировна.** Изменения латеральной подвижности компонентов тилакоидных мембран мутантов *chlorina* ячменя и арабидопсиса, дефектных по биосинтезу хлорофилла *b*

12:40–13:00 **Войцеховская Ольга Владимировна.** Мутанты *chlorina* – модель для экономически значимого повышения продуктивности растений

13:00 – 15:00. ПЕРЕРЫВ НА ОБЕД.

Председатели: О. В. Войцеховская, М. А. Козулева

15:20–15:40 **Худякова Александра Юрьевна.** Влияние дефицита фитохромов на активность фотосистемы 2 при действии УФ-В радиации

15:40–16:00 **Журикова Елена Михайловна.** Исследование участия в фотосинтезе двух альфа-карбоангидраз арабидопсиса

16:00–16:20 **Ашихмин Александр Александрович.** Каротиноиды светособирающих комплексов серных фотосинтезирующих бактерий

16:20–16:40 **Иванов Борис Николаевич.** Образование в тилакоидной мембране, выход из хлоропластов и сигнальная функция H_2O_2

16:40–17:15. КОФЕ-БРЕЙК

17:15–18:30. ОБСУЖДЕНИЕ СТЕНДОВЫХ ДОКЛАДОВ

СРЕДА, 13 СЕНТЯБРЯ

Посвящается памяти профессора
Вячеслава Васильевича Климова (12.01.1945–09.05.2017)

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели: А. Ю. Семенов, Л. Д. Петровская

9:00–9:30 **Мамедов Махир Джафарович**. Влияние трегалозы на фотосистему II

9:30–10:00 **Васильева Людмила Григорьевна**. Исследование механизмов первичных процессов фотосинтеза в реакционных центрах пурпурных несерных бактерий

10:00–10:30 **Богачев Александр Валерьевич**. Na⁺-родопсин, новый класс светозависимых ионных помп

10:30–11:00 **Белозерская Татьяна Андреевна**. Фоторецепторный комплекс и оксипирины в регуляции путей развития *Neurospora crassa*

СЕКЦИЯ 1. ПЕРВИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ ФОТОСИНТЕЗА (КОНФЕРЕНЦ-ЗАЛ)

Председатель: И. И. Проскуряков

11:20–11:40 **Семенов Алексей Юрьевич**. Рекомбинация зарядов в фотосистеме I в условиях ограниченной подвижности белка

11:40–12:00 **Милановский Георгий Евгеньевич**. Температурная зависимость кинетики рекомбинации зарядов в комплексах фотосистемы I цианобактерий

12:00–12:20 **Петрова Анастасия Александровна**. Взаимодействие различных типов комплексов фотосистемы I с экзогенными акцепторами электронов

13:00 – 15:00. ПЕРЕРЫВ НА ОБЕД.

Председатели: Л. Г. Васильева, М. Д. Мамедов

15:00–15:20 **Проскуряков Иван Игоревич**. Механизмы тушения триплетных состояний хлорофиллов в реакционных центрах фотосинтеза

15:20–15:40 **Пищальников Роман Юрьевич**. Моделирование переноса и захвата энергии возбуждения в мономерах и тримерах фотосистемы I цианобактерий

15:40–16:00 **Шелаев Иван Викторович**. Фемтосекундные исследования первичных процессов, протекающих в реакционном центре фотосистемы I, при возбуждении в полосу поглощения

16:20–16:40 **Беляева Наталья Евгеньевна**. Сравнение в модели тилакоида стадий индукции флуоресценции и окисления P700 листьев гороха, адаптированных к темноте или освещению

16:40–17:00 **Плюснина Татьяна Юрьевна**. Математическая модель процессов переноса электрона на донорной стороне фотосистемы II

17:00–17:15. КОФЕ-БРЕЙК

17:15–18:30. ОБСУЖДЕНИЕ СТЕНДОВЫХ ДОКЛАДОВ

СЕКЦИЯ 3. ФОТОРЕЦЕПЦИЯ (МУЗЫКАЛЬНЫЙ ЗАЛ)

Председатель: А. В. Богачёв

11:20–11:45 **Петровская Лада Евгеньевна**. Светозависимый транспорт протонов ретиальным белком *Exiguobacterium sibiricum*

11:45–12:05 **Яковлева Марина Андреевна**. Сравнение времён жизни флуоресценции флуорофоров липофусциновых гранул клеток ретиального пигментного эпителия кадаверных глаз человека, в норме и в случае визуализируемой патологии

12:05–12:25 **Вечтомова Юлия Леонардовна**. «Антенные» молекулы семейства фоторецепторных белков ДНК-фотолиаз / криптохромов

12:25–12:45 **Телегина Таисия Александровна.** Роль фотохимических превращений тетрагидробиоптерина в патогенезе и лечении витилиго

13:00 – 15:00. ПЕРЕРЫВ НА ОБЕД.

Председатель: Т. А. Белозерская

15:00–15:20 **Коппель Лариса Алексеевна.** Функционально разные нативные пулы фитохрома А отличаются друг от друга фосфорилированием по серину в N-концевом сегменте молекулы

15:20–15:40 **Дмитриева Валерия Александровна.** Активные формы кислорода, образование плазмодесм и фитохромная регуляция у мутантов *chlorina Arabidopsis thaliana* и *Hordeum vulgare*

17:00–17:20. КОФЕ-БРЕЙК

17:20–19:00. ОБЩЕЕ СОБРАНИЕ С ОТЧЕТОМ И ОБСУЖДЕНИЕМ-ПРИНЯТИЕМ УСТАВА РОССИЙСКОГО ФОТОБИОЛОГИЧЕСКОГО ОБЩЕСТВА (КОНФЕРЕНЦ-ЗАЛ)

ЧЕТВЕРГ, 14 СЕНТЯБРЯ

СЕКЦИЯ 6. БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ И ФОТНИКА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели: Е. С. Высоцкий, А. Д. Исмаилов

9:00–9:30 **Пуртов Константин Викторович.** Механизм биолюминесценции грибов

9:30–10:00 **Исмаилов Анвар Джураевич.** Светящиеся бактерии арктических морей

10:00–10:30 **Маркова Светлана Владимировна.** Изоформы люциферазы *Metridia longa*: характеристика и перспективы применения в качестве биолюминесцентных репортеров

10:30–11:00 **Ломакина Галина Юрьевна.** АТФ как индикатор метаболической активности клеток

11:15–11:30. КОФЕ-БРЕЙК

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

11:15–11:40 **Новиков Кирилл Николаевич.** Биофотоны (люминесценция): исследования на системе цельной крови

11:40–12:05 **Кудряшева Надежда Степановна.** Изучение токсических и адаптационных эффектов с помощью люминесцентных тестовых систем различного уровня сложности: бактериальных клеток, ферментативных реакций и флуоресцентных белков

12:05–12:30 **Алескерова Лейла Эльшадовна.** Физиологические, спектральные и энергетические характеристики психрофильных фотобактерий

12:30–12:45 **Ларионова Марина Дмитриевна.** Активируемая холодом люцифераза из *Metridia longa*: изучение структурных особенностей экстремофильного белка

12:45–13:00 **Алиева Роза Ришатовна.** Влияние внешних физико-химических факторов на спектрально-люминесцентные свойства разряженного обелина

13:00 – 15:00. ПЕРЕРЫВ НА ОБЕД.

Председатели: С. В. Маркова, Г. Ю. Ломакина

15:00–15:30 **Высоцкий Евгений Степанович.** Ca²⁺-регулируемые фотопротеины морских светящихся организмов

15:30–15:50 **Буракова Людмила Петровна.** Рекомбинантный фотопроtein беровин ктенофор *Beroe abyssicola*: свойства светочувствительного Ca²⁺-регулируемого белка нового типа

15:50–16:10 **Еремеева Елена Владимировна.** Универсальная кинетическая модель биолюминесцентной реакции фотопротеинов

16:10–16:30 **Немцева Елена Владимировна.** Нестационарная кинетика биолюминесцентной реакции бактерий: поиск лимитирующих стадий в условиях высокой вязкости

16:30–16:50 **Башмакова Евгения Евгеньевна.** Определение однонуклеотидных полиморфизмов биолюминесцентным анализом

17:00–17:15. КОФЕ-БРЕЙК

17:15–19:00. ОБСУЖДЕНИЕ СТЕНДОВЫХ И УСТНЫХ ДОКЛАДОВ

ПЯТНИЦА, 15 СЕНТЯБРЯ

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

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

Председатели: А. Е. Соловченко, А. А. Цыганков

9:00–9:30 **Соловченко Алексей Евгеньевич.** Биотехнологическое получение астаксантина из микроводорослей

9:30–9:50 **Хрущев Сергей Сергеевич.** Применение метода спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации кинетики индукции флуоресценции хлорофилла для оценки состояния культуры микроводорослей

9:50–10:10 **Цыганков Анатолий Анатольевич.** Особенности адаптации микроводорослей к недостатку серы в аэробных и анаэробных условиях

10:10–10:30 **Конюхов Иван Владимирович.** Автоматизированная система мониторинга функционального состояния микроводорослей в фотобиореакторах

10:30–10:50 **Беляева Наталья Евгеньевна.** Диагностика производительности фотобиореакторов по кислороду с помощью количественной обработки измерений по выходу флуоресценции в модели фотосистемы 2

11:00–11:15. КОФЕ-БРЕЙК

11:15–11:30. НАГРАЖДЕНИЕ ПОБЕДИТЕЛЕЙ КОНКУРСА ДОКЛАДОВ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

11:30–12:00. ЗАКРЫТИЕ СЪЕЗДА

СТЕНДОВАЯ СЕССИЯ

СЕКЦИЯ 1 ПЕРВИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ ФОТОСИНТЕЗА

1. **Забелин А. А.** Реакционные центры *Rhodobacter sphaeroides* R-26 в условиях вакуума: спектральные свойства и реакции переноса электрона

2. **Нокс П. П.** Изучение температурных зависимостей временных характеристик триптофановой флуоресценции в качестве индикатора структурно-динамического состояния функциональных белков

3. **Разживин А. П.** Перенос энергии возбуждения при фотосинтезе: роль «темных» состояний и зацентровых форм (бактерио) хлорофилла

4. **Семян Б. К.** Влияние периферических белков и Ca^{2+} на транспорт электронов от Q_A^- к Q_B в фотосистеме 2

5. **Таисова А. С.** Вариабельность степени агрегации светособирающих пигментов в периферических антеннах зеленых фотосинтезирующих бактерий

6. **Терехова И. В.** Термостабильность мономеров и тримеров фотосистемы I цианобактерии *Arthrospira platensis*

7. **Хохлов Д.** Моделирование экситонных состояний антенны CP26 фотосистемы II в поляризуемой белковой среде

8. **Христин А. М.** Начальные стадии разделения зарядов в мутантных реакционных центрах *Rhodobacter sphaeroides* с модифицированным редокс-потенциалом первичного донора электрона

9. **Яковлев А. Г.** Фемтосекундная релаксация энергии в реакционных центрах *Rhodobacter sphaeroides*

СЕКЦИЯ 2 РЕГУЛЯЦИЯ ФОТОСИНТЕЗА

10. **Беляева О. Б.** Особенности организации фотосинтетического аппарата ячменя, выращенного на узкополосном красном и синем свете

11. **Лукаткин А. С.** Флуоресценция хлорофилла как индекс устойчивости инвазионных растений к стрессорным абиотическим воздействиям
12. **Махнева З. К.** Встраивание ликопина в антенные комплексы пурпурных серных бактерий
13. **Мудрилов М. А.** Анализ особенностей фотосинтетического ответа в листьях гороха при воздействии раздражителей различной природы
14. **Сухова Е. М.** Влияние переменного потенциала на поглощение энергии фотосистемой II и поток электронов через фотосинтетический аппарат листа гороха

Секция 3. Фоторецепция

15. **Дударева Л. В.** Низкоинтенсивное лазерное излучение – индуктор стрессового ответа в растительной ткани
16. **Стриж И. Г.** Фоторецепторы могут определять стресс-устойчивость растений

Секция 4. Фундаментальные основы фотомедицины

17. **Ковалева В. Д.** Участие фактора транскрипции NF- κ B и растворимой гуанилатциклазы в генерации NO в нейронах и глиальных клетках при ФД-воздействии
18. **Любицкий О. Б.** Применение метода хемиллюминесценции для оценки образования синглетного кислорода в водных суспензиях липосом
19. **Монич В. А.** Эффекты последовательного облучения мышечных тканей лазерным излучением высокой интенсивности и широкополосным светом
20. **Негинская М. А.** Фотодинамическое воздействие Радахлорина стимулирует изменения уровня кальция в нейронах и астроцитах
21. **Плавский В. Ю.** Фотосенсибилизирующие свойства полиенового антибиотика «АМФОТЕРИЦИН В»

22. **Плавский В. Ю.** Исследование механизмов биологического действия оптического излучения на эмбрионы и сперму рыб
23. **Самцов М. П.** Влияние связывания с белками плазмы крови на спектральные характеристики полиметиновых фотосенсибилизаторов для ФДТ
24. **Симаков Ю. Г.** Фотодинамический фактор некроза опухолей (ФНО) – действие на опухолевые клетки в культуре
25. **Узденский А. Б.** Фототромботический инсульт: экспрессия сигнальных белков в переходной зоне
26. **Шмиголь Т. А.** Антимикробные фотодинамические эффекты МЕРОЦИАНИНА 540: исследования *in vitro* и *in vivo*
27. **Яковец И. В.** Сравнительное исследование процессов накопления фотосенсибилизаторов с различной химической структурой в опухолевых клетках

Секция 5. Биофотоника молекул и наночастиц

28. **Аллахвердиев С. И.** Разработка и оптимизация солнечной ячейки на основе диоксида титана и различных растительных пигментов
29. **Беликов Н. Е.** Разработка новых фотохромных систем
30. **Беликов Н. Е.** Влияние модификации хромофорной группы на спектральные свойства ретинальсодержащих белков
31. **Воробей А. В.** Фотодеструкция фолатов: механизмы, цитотоксическое действие и использование в биологии и медицине
32. **Гармаза Ю. М.** Флуоресцентные зонды в исследовании биологии цинка
33. **Демина О. В.** Новый тип фотоуправляемых меток для различных биологических лигандов
34. **Жихорева А. А.** Спектр и времена жизни люминесценции питательной среды ДМЕМ
35. **Залесский А. Д.** Использование фемтосекундной лазерной нанохирургии и лазерного пинцета в исследовании механики живых GV-ооцитов мыши

36. **Игнатова А. А.** Суперпарамагнитные наночастицы на основе оксида железа, функционализированные молекулами фолиевой кислоты: взаимодействия с клетками рака груди
37. **Луговский А. А.** Новые флуоресцентные зонды для детекции амилоидных фибрилл
38. **Плавский В. Ю.** Билирубин в клетках ткани: фотоника и сенсibiliзирующие свойства
39. **Родионова М. В.** Выявление новых ингибиторов глутатионредуктазной, карбоангидразной, а также фотосинтетической активности фотосистемы 2 растений
40. **Самцов М. П.** Влияние конъюгации индотрикарбоцианиновых фотосенсибилизаторов с полиэтиленгликолем на их взаимодействия с опухолевыми клетками
41. **Тамашевский А. В.** Влияние танинов растительного происхождения на функционирование белков множественной лекарственной устойчивости в лимфоцитах человека
42. **Шахов А. М.** Создание флуоресцентных центров в ооцитах мышцы с помощью фемтосекундных лазерных импульсов

Секция 6. Биолюминесценция и фотоника флуоресцентных белков

43. **Вышедко А. М.** Возможности применения биолюминесцентного тестирования слюны в оценке влияния физической нагрузки на функциональное состояние организма спортсменов
44. **Горбунова Д. А.** Оптимизация свойств люциферазы *Metridia longa* как биолюминесцентного репортера методом случайного мутагенеза
45. **Зубрицкая Г. П.** Люминесцентные способы диагностики нефропатий у новорожденных
46. **Калябина В. П.** Оценка качества сельскохозяйственных продуктов питания биолюминесцентным методом
47. **Петрова А. С.** Флуоресцентный целентерамид-содержащий протеин обелин как перспективный биотест на радиационную токсичность

48. **Степанова Л. В.** Биолюминесцентное тестирование слюны для оценки физического здоровья молодежи
49. **Фрицлер Я. В.** Анализ ингибирующего воздействия наноматериалов на активность ряда ферментов

Секция 7 Микроводоросли как преобразователи солнечной энергии в биотоплива и ценные продукты

50. **Волгушева А. А.** Изучение физиологической роли фотопродукции водорода в клетках *C. reinhardtii* в условиях биогенного голодания
51. **Воронова Е. Н.** Культивирование сообщества зеленых водорослей в фотобиореакторе для очистки сточных вод городских очистных сооружений
52. **Минюк Г. С.** Зелёная микроводоросль *Coelastrella rubescens* как перспективный источник кетокаротиноидов и липидов
53. **Погосян С. И.** Биофизические аспекты фотобиотехнологии

СЕКЦИЯ 1. ПЕРВИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ ФОТОСИНТЕЗА

СРАВНЕНИЕ В МОДЕЛИ ТИЛАКОИДА СТАДИЙ ИНДУКЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ И ОКИСЛЕНИЯ P700 ЛИСТЬЕВ ГОРОХА, АДАПТИРОВАННЫХ К ТЕМНОТЕ ИЛИ ОСВЕЩЕНИЮ Quantifying induction events with thylakoid model fitting to fluorescence and P700 oxidation data of dark adapted and preilluminated pea leaves

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

Department of Biophysics, Biology Faculty of the M. V. Lomonosov Moscow State University, 119992, Moscow, Russia
E-mail: natalmurav@yandex.ru

Changes in thylakoid membrane energization *in vivo* that are induced by dark-light transitions were probed. Simultaneous measurements of fluorescence induction (FI) and P700⁺ oxidoreduction changes (ΔA_{810}) were monitored on pea leaves at photon flux density (PFD) of 200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ during the 30 s time range. The present Thylakoid model (TM) was fitted to FI and ΔA_{810} data obtained on dark-adapted leaves. The two-wave kinetics of O(JI)PSMT and OABCD were reproduced in their parallel and antiparallel phases due to the TM parameter quantification while time scale of simulations was extended up to 30 s. Improvements of the previous TM model [1] were achieved under assumption that 20% of F_0 is attributed to PSI. The time-dependent rate constant was introduced in order to model NADP⁺ reduction by ferredoxin after FNR activation in the time domain of 20–40 s from the start of a low intensity illumination.

A further progress was based on dynamic modification of the rate constant of radiationless excitation energy dissipation in PSII antenna (k_D). Without an explicit description of the mechanism, we suggested that the high energy qE quenching is triggered by low luminal pH. An increase in qE enhances the de-excitation of 'Chl*' as heat in PSII antenna. Then, the k_D increase from the basic value was described by a Hill-type equation with the Michaelis constant corresponding to a switch point at pH 5.2. So the qE activation dynamics allowed fitting of SMT kinetic stages and P700⁺ oxidation levels.

In addition, the FI and ΔA_{810} data were obtained on dark-adapted (10 min) leaves that were preilluminated for 10 s, and then darkened for 10 s prior to 30-s illumination. The TM calculations revealed that the PSII redox cofactors must be initially in reduced states to explain the FI kinetics. Further investigations are necessary to explain the ΔA_{810} data in correlation with FI stages due to possible relaxation effects after light switching off.

1. Belyaeva N. E., Bulychev A. A., Riznichenko G. Yu., Rubin A. B. (2016) Thylakoid membrane model of the Chl *a* fluorescence transient and P700 induction kinetics in plant leaves. *Photosynthesis Research*, 130(№ 1-3):491–515

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ПЕРВИЧНЫХ ПРОЦЕССОВ ФОТОСИНТЕЗА В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ ПУРПУРНЫХ НЕСЕРНЫХ БАКТЕРИЙ Study of mechanisms of the primary photosynthetic processes in reaction centers of purple non-sulfur bacteria

Людмила Васильева¹, Татьяна Фуфина¹, Георгий Селиханов², Азат Габдулхаков², Равиль Хатыпов¹, Анатолий Шкуропатов¹, Владимир Шувалов¹

1 – Институт фундаментальных проблем биологии, г Пушкино, ул. Институтская, 2
E-mail: vsyulya@mail.ru, тел. (4967)73-26-80
2 – Институт белка, г. Пушкино, ул. Институтская, 4

Фотосинтетический реакционный центр (РЦ) пурпурных несерных бактерий – это мембранный пигмент-белковый комплекс, который относится к тому же типу РЦ, что и фотосистема 2 растений, но более просто устроен и относительно стабилен. РЦ *Rba. sphaeroides* состоит из трех белковых субъединиц (L, M и H) и десяти кофакторов, образующих две пространственно симметричные ветви (A и B). Квантовый выход первичного процесса разделения зарядов в РЦ близок к единице при всех температурах. Такая высокая эффективность фотобиологического процесса достигается путем регулировки свойств кофакторов через их взаимодействия друг с другом и с окружающим белком. В литературе предполагается несколько аспектов роли белка в РЦ [Parson, 2009]. Белок рассматривается как матрица, определяющая оптимальную геометрию кофакторов для достижения высокой квантовой эффективности. Аминокислотное окружение также, по-видимому, осуществляет тонкую подстройку спектральных и электрохимических свойств пигментов, необходимых для выполнения их функции в процессе переноса электрона. Не исключено и более прямое участие белкового компонента РЦ в процессе разделения зарядов. Есть экспериментальные данные в пользу того, что конформационная динамика белка играет ключевую роль в кинетике реакций переноса электрона в бактериальных РЦ [Wang et al., 2007; Medvedev et al., 2008]. С помощью сайт-направленного мутагенеза нами получена и охарактеризована серия мутантных РЦ с целью выяснения влияния структурных факторов (водородных связей, типов лигандирования молекул бактериохлорофилла) на фотохимическую активность и стабильность бактериальных РЦ. Для ряда из них получены кристаллы и расшифрована пространственная структура мутантных РЦ. [Леонова и соавт., 2011; Vasilieva et al., 2012].

Работа поддержана грантами МКБ, РФФИ и ВНШ 4771.2014.4.

1. Леонова М. М. и др. (2011) *Успехи биологической химии*, 51, 193–232.
2. Parson W. W. and A. Warshel (2009) In: Media. Springer Netherlands, pp 355–377.
3. Medvedev E. S., et al (2008) *J Phys Chem B*, 112:3208–16.
4. Vasilieva L. G. et al. (2012) *Biochim. Biophys. Acta*, 1817 (8), 1407–1417.
5. Wang H., et al., (2007) *Science*, 316, 747–750.

РЕАКЦИОННЫЕ ЦЕНТРЫ *Rhodobacter sphaeroides* R-26 В УСЛОВИЯХ ВАКУУМА: СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА И РЕАКЦИИ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА
Reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* R-26 in vacuum conditions: spectral properties and electron-transfer reactions

Алексей Забелин*, Антон Христин, Валентина Шкуропатова,
 Анатолий Шкуропатов

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

E-mail: zabelin.bio@gmail.com

Фотосинтетический реакционный центр (РЦ) представляет собой трансмембранный пигмент-белковый комплекс, который преобразует энергию квантов света в электрохимическую энергию разделенных зарядов в серии сверхбыстрых реакций переноса электрона. Исследование РЦ в вакууме представляет большой интерес в связи с выяснением роли гидратной оболочки РЦ в переносе электрона. Кроме того, создание твердотельных биоэлектронных устройств на основе РЦ в качестве фотоактивного материала сопряжено с необходимостью сохранения структурной целостности и фотохимической активности РЦ в условиях вакуума. В связи с этим, методами оптической спектроскопии в видимой и ближней ИК областях было исследовано влияние цвиттерийонного детергента N,N-диметилдодециламино N-оксида (ЛДАО) и двух неионных детергентов Тритона X-100 (TX100) и n-додецил-β-D-мальтозида (DM) на спектральные свойства РЦ *Rhodobacter (Rba.) sphaeroides* в белок-детергентном слое в условиях вакуума (10⁻² мм. рт. ст.). Было обнаружено, что только DM образует наиболее «дружелюбную» среду, позволяющую стабилизировать спектральные и функциональные свойства реакционных центров в условиях вакуума. Методом фотоиндуцированной дифференциальной инфракрасной спектроскопии с Фурье преобразованием исследован эффект дегидратации в вакууме на электронную структуру катион-радикала димера P⁺ и молекулярные свойства P и P⁺ в РЦ *Rba. sphaeroides* R-26. Найдено, что удаление воды приводит к увеличению степени локализации положительного заряда на одной из половин катион-радикала димера P⁺ вследствие, по-видимому, небольших изменений структуры димера P (или) его взаимодействий с ближайшим аминокислотным окружением. Первичные реакции переноса электрона в вакуум-сухих пленках РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 исследовались методом фотоиндуцированной дифференциальной спектроскопии с фемтосекундным временным разрешением. Обнаружено, что дегидратация пленки РЦ-DM заметно влияет на кинетику затухания возбужденного состояния первичного донора электрона P*, вызывая появление новой компоненты с временем жизни 45 пс и амплитудой 40%. Квантовый выход разделения зарядов с образованием состояния P⁺Q_A⁻ в дегидратированных РЦ уменьшается до 80% по сравнению с РЦ в растворе.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №16-34-00829.

ВЛИЯНИЕ ТРЕГАЛОЗЫ НА ФОТОСИСТЕМУ II
Influence of trehalose on photosystem II

**M. D. Mamedov¹, D. V. Yanykin², A. A. Khorobrykh², V. V. Klimov²,
 A. Yu. Semenov¹**

¹ – A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University,
 119234, Moscow, Russia;

E-mail: mahirmamedov@yandex.ru; Fax: +7(495) 9393181

² – Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, Pushchino
 142290 Moscow Region, Russia

Pigment-protein complex of photosystem II (PS II) in thylakoid membranes of chloroplasts and cyanobacteria catalyze the light-driven oxidation of water and reduction of plastoquinone molecules. The water-oxidizing complex (WOC) of PS II is the most fragile site within PS II and is easily susceptible to oxidative damage. In this regard, the study of influence of the protectors on the PS II is of particular interest. In the present work, it has been shown that disaccharide trehalose in solution significantly stimulates the steady state rate of oxygen evolution in PS II complexes. We proposed that prevention of the time-dependent degradation of PS II in the presence of this disaccharide could be explained by stabilization of the reaction centre [1]. A significant activation of electron transfer on both the acceptor and the donor sides of Mn-depleted PS II (apo-WOC-PS II) complexes accompanied by a two-fold increase in the rate of oxygen photo-consumption were revealed upon addition of 1 M trehalose [2]. In addition, investigation of the effect of trehalose on photoinhibition in apo-WOC-PS II preparations showed that disaccharide increases the capability of manganese (both exogenous and endogenous) to donate electrons to reaction centre and strengthens the protective properties of Mn during photoinhibition, probably due to disaccharide-induced structural changes at the oxidizing side of PS II [3].

1. Mamedov M. D., Petrova O. I., Yanykin D. V., Zasp A. A., Semenov A. Y.,
Biochemistry (Moscow), 2015, 80, 61–66

2. Yanykin D. V., Khorobrykh A. A., Mamedov M. D., Klimov V. V., *J. Photochem. Photobiol. B.*, 2015, 152, 279–285

3. Yanykin D. V., Khorobrykh A. A., Mamedov M. D., Klimov V. V., *J. Photochem. Photobiol. B.*, 2016, 164, 236–243

ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ КИНЕТИКИ РЕКОМБИНАЦИИ ЗАРЯДОВ В КОМПЛЕКСАХ ФОТОСИСТЕМЫ I ЦИАНОБАКТЕРИЙ
Temperature dependence of charge recombination kinetics in cyanobacterial photosystem I complexes

Георгий Милановский¹, Охана Горта^{1,2}, Анастасия Петрова¹, Махир Мамедов¹, John Golbeck², Дмитрий Черепанов³, Алексей Семенов¹

1 – НИИ Физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, МГУ, 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр 40, факс +7-495-939-03-38,

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

2 – Department of Biochemistry & Molecular Biology, Pennsylvania State University, Pennsylvania, USA.

3 – Институт химической физики имени Н. Н. Семенова РАН

Кинетика рекомбинации зарядов в комплексах фотосистемы I (ФС I) из цианобактерии *Synechocystis sp.* PCC 6803 была исследована в диапазоне температур от 4 К до 320 К путем регистрации индуцированных лазерными вспышками абсорбционных изменений на длине волны 820 нм, которые отражают кинетику восстановления фотоокисленного первичного донора электрона P_{700}^+ . Температурная зависимость кинетики рекомбинации была изучена для нативных комплексов ФС I, а также для ФС I с удалёнными терминальными железо-серными кластерами F_A/F_B (F_X -core) и ФС I, выделенной из мутантного штамма *RubA* с отсутствующими железо-серными кластерами $F_X/F_A/F_B$ (A_1 -core). Анализ полученных кинетик с помощью разработанной кинетической модели переноса электрона в ФС I и программы CONTIN [1] позволил выявить вклады реакций рекомбинации с отдельных кофакторов комплекса на P_{700}^+ , определить их кинетические параметры и энергии активации в широком диапазоне температур.

Для комплексов A_1 -core впервые показана прогрессирующая асимметрия первичного разделения зарядов между ветвями редокс-кофакторов *A* и *B* при температурах ниже 150 К и предложена теория, объясняющая этот феномен с привлечением квантовой химии.

Кинетика рекомбинации с терминальных железо-серных кластеров становится гетерогенной при температурах ниже ~200 К, что может свидетельствовать о «замораживании» электрона в различных областях кластера, с соответствующим изменением расстояния и скорости переноса электрона. Кинетика рекомбинации зарядов в нативном комплексе ФС I и в комплексе F_X -core не зависели от температуры при температурах ниже 150 К, т. е. реакции рекомбинации со всех кофакторов системы имели нулевую энергию активации ниже температуры стеклования белка.

Для кинетики рекомбинации зарядов при температуре выше 290 К было получено значение энергии активации ~300 мВ, что несколько выше значения 220 мВ, полученного ранее [2], но может быть объяснено в рамках представления о двух путях рекомбинации с кластера F_X – напрямую к первичному донору P_{700} и через вторичный филлохиноновый акцептор A_1 в качестве промежуточного звена.

1. Provencher S. W. (1982) *Computer Physics Communications*, 27(3), 229–242

2. Jordan, R., Nessau, U., Schlodder, E., (1998) In G. Garab, ed. *Photosynthesis: Mechanisms and Effects: Volume I Proceedings of the XIth International Congress on Photosynthesis, Budapest, Hungary, August 17--22, 1998*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 663–666.

ИЗУЧЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРНЫХ ЗАВИСИМОСТЕЙ ВРЕМЕННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ТРИПТОФАНОВОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В КАЧЕСТВЕ ИНДИКАТОРА СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ
The study of temperature dependencies of tryptophan fluorescence temporary characteristics as the indicator of structure-dynamic state of functional proteins

Петр Нокс, Борис Корватовский, Владимир Горохов, Владимир Пашенко

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

E-mail: knox@biophys.msu.ru; korbor@rambler.ru; Fax: +7-495-939-11-15

Флуоресцентная спектроскопия триптофанилов в составе белков широко используется в качестве природного внутреннего индикатора конформации белков, их динамики, межмолекулярных взаимодействий. Динамическое (спектрально-кинетическое) поведение молекул триптофана очень чувствительно к состоянию окружающей среды. В качестве показателя состояния внутримолекулярной динамики белка, в том числе от температуры, уже давно измеряют положение максимума спектра флуоресценции белковых триптофанилов, определяемое релаксационными характеристиками полярного окружения возбужденного хромофора. Сложнее ситуация с интерпретацией влияния состояния окружения на длительность флуоресценции белковых триптофанилов. Детальное выяснение природы локальных изменений окружения триптофановых остатков в структуре белка, влияющих на регистрируемые в эксперименте зависимости от температуры длительности флуоресценции, требует тщательных комплексных исследований. Возможным подходом на этом пути является изучение температурных зависимостей времени жизни флуоресценции чистого триптофана в различных средах.

Исследовали температурные зависимости кинетик затухания флуоресценции молекул триптофана в глицериновом растворе и в трегалозной матрице. Кинетики затухания флуоресценции измерялись в спектральной области 250–380 нм с наносекундным временным разрешением. Аппроксимация кинетик затухания флуоресценции проводилась в трехэкспоненциальном приближении, определялось спектральное распределение (DAS) этих компонентов. Был обнаружен антибатный ход температурных зависимостей времен затухания флуоресценции двух (быстрой и средней) компонентов в температурном диапазоне от –60°C до 25°C. Третья (медленная) компонента показывала слабую зависимость от температуры. Антибатное поведение времен затухания флуоресценции двух компонентов моделировалось в предположении, что в определенном температурном интервале происходит переход части молекул триптофана, находящихся в возбужденном состоянии, из коротковолновой формы, обладающей коротким временем жизни флуоресценции, в длинноволновую форму с промежуточным временем жизни флуоресценции.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (Грант № 15-29-01167 офм_м).

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ КОМПЛЕКСОВ ФОТОСИСТЕМЫ I С ЭКЗОГЕННЫМИ АКЦЕПТОРАМИ ЭЛЕКТРОНОВ

Анастасия Петрова¹, Георгий Милановский¹, Банна Босхонджиева²,
Дмитрий Черепанов³, Махир Мамедов¹, Алексей Семенов¹

1 – НИИ Физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова
E-mail: draparnaldia@gmail.com; Fax: +7-495-939-0338

2 – Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М. В. Ломоносова

3 – Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН

Было исследовано взаимодействие нативных и модифицированных комплексов фотосистемы I (ФС1) из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 с экзогенными акцепторами электронов. Данные о влиянии экзогенных акцепторов электрона на кинетику восстановления фотоокисленного первичного донора P_{700} в различных типах комплексов были использованы для разработки кинетической модели реакций прямого и обратного электронного транспорта, что позволяет оценить вклад различных факторов в эти процессы.

В работе были проанализированы комплексы, содержащие различные хиноны в сайте связывания A_1 : филлохинон (P_hQ) в комплексах ФС1 дикого типа, пластохинон (PQ) или 2,3-дихлор-1,4-нафтохинон (Cl₂NQ) в комплексах из мутантного штамма *menB*, а также модифицированные комплексы с различным числом железо-серных Fe₄S₄ кластеров (интактные комплексы дикого типа и F_x-core комплексы, лишённые терминальных кластеров F_A/F_B). Эффективность взаимодействия с экзогенными акцепторами была оценена путем регистрации изменений оптической плотности на длине волны 820 нм в ответ на вспышку света, обусловленных восстановлением фотоокисленного первичного донора электронов P_{700} . На основе полученных данных была построена кинетическая модель, описывающая как рекомбинацию зарядов, так и прямые реакции переноса электрона. Взаимодействие ФС1 с экзогенными акцепторами было описано в терминах уравнения Михаэлиса-Ментен. Было показано, что эффективность взаимодействия MB с ФС1 монотонно уменьшается в ряду: интактные комплексы дикого типа > *menB* > F_x-core. Механизм взаимодействия ФС1, содержащей в сайте A_1 Cl₂NQ, с MB отличался от такового для всех остальных типов комплексов. В то же время, добавленный экзогенно Cl₂NQ способен акцептировать электроны от F_A/F_B и от F_x даже более эффективно, чем MB. Полученная модель позволила оценить ΔG реакций терминальных этапов переноса электрона, которая составила –130 мэВ между F_x и F_A/F_B, и –50 и –220 мэВ для переноса электрона между филлохиномом A_1 и F_x в A и B ветвях, соответственно.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №17-14-01323

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПЕРЕНОСА И ЗАХВАТА ЭНЕРГИИ ВОЗБУЖДЕНИЯ В МОНОМЕРАХ И ТРИМЕРАХ ФОТОСИСТЕМЫ I ЦИАНОБАКТЕРИЙ Modelling of the energy transfer and the charge separation in monomers and trimers of cyanobacterial photosystem I

Роман Ю. Пищальников¹, Андрей П. Разживин²

1 – Институт общей физики им. А. М. Прохорова, РАН, Москва, 119991, ул. Вавилова, 38;
E-mail: rpishchal@kapella.gpi.ru; Fax: +7-499-135-02-70

2 – Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, МГУ, Москва,
119992, Ленинские горы, дом 1, стр. 40

Определение пространственного положения длинноволновых форм хлорофилла в мономерах и тримерах пигмент-белкового комплекса фотосистемы I (ФС1) является одной из актуальных проблем в изучении первичных процессов фотосинтеза. Для решения данной задачи нами было проведено одновременное моделирование спектров оптического поглощения и кинетических кривых, полученных методом накачки-зондирования при комнатной температуре на препаратах мономеров и тримеров ФС1 с окисленными и восстановленными реакционными центрами.

Принимая во внимание результаты наших предыдущих исследований [1], нами была предложена квантовая модель миграции энергии в мономере и тримере ФС1 на основе модифицированной теории Редфилда. Энергия взаимодействия между хлорофиллами, находящимися на расстоянии меньше 10 Å, оценивалась с помощью «расширенного» диполь-дипольного взаимодействия. Величина энергии Qu перехода для каждой молекулы хлорофилла подбирались с помощью метода глобальной оптимизации – дифференциальной эволюции. Исследованные модели тримера ФС1 позволили оценить степень влияния экситонного взаимодействия периферических пигментов мономера на величину оптического тримера ФС1. Визуализация матрицы плотности для низкоэнергетических экситонных состояний позволила сделать оценку локализации длинноволновых форм хлорофилла в тримере ФС1.

1. R. Yu. Pishchalnikov, V. V. Shubin, A. P. Razjivin, *Physics of Wave Phenomena*, 2017, 25(3), (accepted)

**МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕНОСА
ЭЛЕКТРОНА НА ДОНОРНОЙ СТОРОНЕ ФОТОСИСТЕМЫ II**
Mathematical model of electron transfer processes on the donor side of
photosystem II

Татьяна Плюснина, Сергей Хрушев, Наталья Дегтерева

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра биофизики, Ленинские Горы 1, стр. 12, Москва 119234, Россия;
E-mail: styx@biophys.msu.ru; +7 (495) 939-14-02

Математическое моделирование процессов переноса электронов в ФС II является одним из широко применяемых методов оценки эффективности фотосинтетического аппарата растений. Отдельные стадии переноса электронов в ФС II хорошо изучены, что позволяет строить детальные модели, описывающие десятки состояний ФС II и переходы между ними. Однако, большинство моделей фокусируется на детализации процессов на акцепторной стороне ФС II, при этом процессы на донорной стороне описываются с разной степенью упрощения, поскольку их детальное описание увеличивает число состояний и, соответственно, число переменных модели до нескольких сотен и сильно усложняет анализ такой модели. В задачу нашей работы входило построение такой модели, которая бы детально описывала процессы на донорной стороне. Для того, чтобы уменьшить общее число описываемых состояний, мы рассмотрели ФС II под действием DCMU, широко известного гербицида, который ингибирует фотосинтетическую активность, блокируя сайт связывания пластохинона Q_B в фотосистеме II.

Разработанная математическая модель включает детальное описание переходов между состояниями кислород выделяющего комплекса, перенос электрона на донорной стороне ФС II, восстановление первичного хинона Q_A на акцепторной стороне и состоит из 26 обыкновенных дифференциальных уравнений. Была проведена оценка значений параметров, при которых данная система может корректно использоваться. Для верификации модели были использованы экспериментальные кривые индукции флуоресценции, полученные для нескольких видов зеленых и желто-зеленых водорослей. Было получено хорошее совпадение модельных и экспериментальных кривых. Далее, учитывая иерархию времен на разных стадиях переноса электрона и используя теорему Тихонова, мы редуцировали модель. В результате была получена упрощенная модель, состоящая из трех дифференциальных уравнений. Ее решение в диапазоне времен экспериментальной индукционной кривой полностью совпадает с решением исходной детальной модели. Было найдено аналитическое решение системы, представляющее сумму трех экспоненциальных функций, характерные времена которых выражаются через константы элементарных стадий исходной детальной модели. Полученное аналитическое решение было использовано для оценки состояния кислород выделяющего комплекса по кривым индукции флуоресценции. Был проведен анализ кривых индукции флуоресценции, полученных на разных стадиях роста накопительной культуры микроводорослей при истощении азота в среде. Показано, что наступление голодания по азоту сопровождается уменьшением константы перехода S_1-S_2 кислород выделяющего комплекса.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №17-04-00676.

**МЕХАНИЗМЫ ТУШЕНИЯ ТРИПЛЕТНЫХ СОСТОЯНИЙ
ХЛОРОФИЛЛОВ В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ ФОТОСИНТЕЗА**
Chlorophyll triplet state quenching in reaction centers of photosynthesis

И. И. Проскуряков, И. Б. Кленина, Т. Ю. Фуфина

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пушкино, Московская область, ул. Институтская 2, 142290, Россия
E-mail: pros@issp.serpukhov.su, Fax: +7-496-773-05-32

Заселение триплетных состояний основных пигментов (хлорофиллы и бактериохлорофиллы) представляет для фотосинтезирующих организмов значительную опасность, поскольку эти состояния при взаимодействии с кислородом воздуха могут вызывать образование химически активного синглетного кислорода. В большинстве случаев проблема триплетных пигментов решается их тушением за счет быстрого T-T переноса энергии на молекулы каротиноидов. По ряду причин такой механизм может быть реализован не во всех случаях. Однако и в отсутствие переноса энергии на каротиноиды триплеты хлорофиллов некоторых типов реакционных центров (РЦ) оказываются короткоживущими. Методами ЭПР высокого временного разрешения и оптической спектроскопии в магнитном поле мы исследовали бактериальные реакционные центры в условиях однократно-восстановленного (парамагнитного) первичного акцептора электрона. Обнаружено, что наложение магнитного поля (до 4 кГс) оказывает, в зависимости от условий восстановления первичного акцептора РЦ, различное влияние на время жизни триплетов первичного донора. При низкой концентрации восстановителя (аскорбата натрия) 1 мМ включение поля увеличивает это время (положительный эффект). При концентрации аскорбата 10 мМ и длительном (до двух часов) освещении препаратов при $T = 260$ К магнитное поле ускоряет распад 3P (отрицательный эффект). Нами высказано предположение, что наблюдаемое при однократном восстановлении первичного акцептора РЦ тушение триплетов протекает по механизму радикал-триплетных пар (РТП). Этот механизм достаточно часто привлекается для описания процессов в органической фотофизике, но ранее не обсуждался в применении к фотосинтезу. Взаимодействие триплетных и радикальных состояний делает синглет-триплетный переход разрешенным по спине и может приводить к весьма эффективному тушению триплетов. Эффективность тушения триплетных состояний по этому механизму зависит от магнитного поля. В рамках механизма РТП находит объяснение как положительный, так и отрицательный эффект магнитного поля. Параллельно тушению триплетных состояний происходит накачка неравновесной спиновой поляризации взаимодействующего с ними радикала Q_A^- . Такая накачка обнаружена в некоторых типах реакционных центров. Обсуждаемый механизм тушения триплетных состояний может играть существенную роль в защите от генерации 1O_2 также в более широком круге фотосинтетических пигмент-белковых комплексов.

Авторы выражают благодарность фонду РФФ (грант 14-14-00535) за финансовую поддержку работы.

**ПЕРЕНОС ЭНЕРГИИ ВОЗБУЖДЕНИЯ ПРИ
ФОТОСИНТЕЗЕ: РОЛЬ “ТЕМНЫХ” СОСТОЯНИЙ И
ЗАЦЕНТРОВЫХ ФОРМ (БАКТЕРИО)ХЛОРОФИЛЛА**
Excitation energy transfer in photosynthesis: the role of the “dark” states
and “red” forms of (bacterio)chlorophyll

Андрей Разживин

НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, Московский
государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, 119991, Москва, Россия;
E-mail: razjivin@belozersky.msu.ru; Fax: +7-495-939-03-38;

При поглощении квантов света пигментные молекулы светособирающей антенны переходят в возбужденные состояния. Это могут быть синглетные возбужденные состояния отдельных молекул, возбужденные экситонные уровни взаимодействующих пигментов или возбужденные уровни состояний с переносом заряда пигментов. Часть переходов на эти уровни видна в оптических спектрах в виде полос однофотонного поглощения. Другая часть уровней запрещена для однофотонных переходов и в обычных спектрах не проявляется, например переход $S_0 \rightarrow S_1$ молекул каротиноидов, переходы на высокие экситонные состояния в кольцевых агрегатах пурпурных бактерий, некоторые состояния с переносом заряда у пигментов. Это так называемые «темные» состояния. Но на процессы переноса энергии возбуждения между пигментами этот запрет не распространяется, то есть «темные» состояния пигментов могут участвовать в процессах переноса и захвата энергии возбуждения при фотосинтезе.

Другая проблема переноса энергии связана с наличием в антенне длинноволновых «красных» форм хлорофилла, которые должны конкурировать с реакционным центром P700 в фотосистеме I цианобактерий.

В докладе обсуждаются данные по переносу энергии от высоких возбужденных состояний бактериохлорофилла, роль длинноволновых форм хлорофилла в переносе энергии возбуждения на реакционный центр P700 и природа «темного» состояния бактериохлорофилла кольцевых агрегатов светособирающих комплексов пурпурных бактерий.

**РЕКОМБИНАЦИЯ ЗАРЯДОВ В ФОТОСИСТЕМЕ I
В УСЛОВИЯХ ОГРАНИЧЕННОЙ ПОДВИЖНОСТИ БЕЛКА**

**Алексей Семенов¹, Марко Малфerrари², Оксана Гопта^{1,3}, Махир Мамедов¹,
Анастасия Петрова¹, Георгий Милановский¹, Дмитрий Черепанов⁴,
Джованни Вентуроли², Джон Гольбек³**

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

E-mail: semenov@genebee.msu.ru; Fax: +7-495-939-0338

2 – Университет г. Болоньи, Болонья, Италия

3 – Университет штата Пенсильвания, Стейт Колледж, США

4 – Институт химической физики имени Н. Н. Семенова РАН, Москва, Россия

Влияние конформационной динамики белка на кинетику переноса электрона было исследовано на комплексах фотосистемы I (ФС I), высушенных в трегалозной матрице при различной влажности. В стекловидной матрице при относительной влажности 11% ФС I была стабильной при комнатной температуре в течение многих месяцев. Кинетика рекомбинации зарядов в ФС I при возбуждении лазерной вспышкой была изучена с помощью субмикросекундной абсорбционной спектроскопии путем регистрации восстановления фотоокисленного первичного донора электрона P700⁺ на длине волны 820 нм. При высокой влажности кинетика рекомбинации была, главным образом, обусловлена обратным переносом электрона от терминальных восстановленных железо-серных центров $[F_A/F_B]^-$ на фотоокисленный первичный донор электрона P700⁺. При последовательной дегидратации кинетика рекомбинации ускорялась и становилась более распределенной. При этом вклад наиболее быстрых компонент (от 0,15 мс до нескольких мс), обусловленных обратным переносом электрона от филлохинонового акцептора A₁⁻ и железо-серного кластера F_X⁻ на P700⁺ возрастал за счет уменьшения вклада более медленных компонент (60–300 мс), обусловленных рекомбинацией с терминальных кластеров $[F_A/F_B]^-$.

Рекомбинация зарядов в комплексах ФС I была изучена также в водно-глицериновом растворе в широком диапазоне температур. Было показано, что вклад медленных кинетических компонент, обусловленных рекомбинацией ион-радикальной пары P700⁺ $[F_A/F_B]^-$ уменьшался при понижении температуры одновременно с увеличением вклада более быстрых компонент, приписанных к восстановлению P700⁺ от предшествующих акцепторов A₁⁻ и F_X⁻. Эффект температуры был сходен с эффектом высушивания в трегалозной матрице, но не идентичен ему. В частности, дегидратация ФС I в трегалозной матрице не влияла на быструю компоненту рекомбинации между A₁⁻ и P700⁺, в отличие от понижения температуры. Тем не менее, в целом, кинетика рекомбинации зарядов ФС I в высушенной трегалозной матрице была сходна с кинетикой, наблюдавшейся в водно-глицериновой смеси при температуре стеклования белка (~170–180 K).

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №17-14-01323

**ВЛИЯНИЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ БЕЛКОВ И Ca^{2+} НА ТРАНСПОРТ
ЭЛЕКТРОНОВ ОТ Q_A^- К Q_B В ФОТОСИСТЕМЕ 2**
Effects of extrinsic proteins and Ca^{2+} on the electron transfer from Q_A^- to Q_B in
photosystem II

Boris K. Semin¹, Lira N. Davletshina¹, Mahir D. Mamedov²

1 – Department of Biophysics, Faculty of Biology M. V. Lomonosov Moscow State
University, 119234 Moscow, Russia;

E-mail: semin@biophys.msu.ru; Fax: +7(495)939-11-15

2 – A. N. Belozersky Institute of Physical-Chemical Biology, Moscow State University,
119234 Moscow, Russia

Extrinsic proteins PsbO, PsbP, and PsbQ of photosystem II (PSII) protect the catalytic cluster Mn_4CaO_5 of oxygen-evolving complex (OEC) from the bulk solution and from soluble compounds in the surrounding medium. Extraction of PsbP and PsbQ proteins by NaCl washing together with chelator EGTA is followed also by depletion of Ca^{2+} cation from OEC. In this study, the effects of PsbP and PsbQ proteins, as well as Ca^{2+} extraction from OEC on the kinetics of the reduced primary electron acceptor (Q_A^-) oxidation have been studied by fluorescence decay kinetics measurements in PSII membrane fragments. We found that in addition to the impairment of OEC, removal of PsbP and PsbQ significantly slows the rate of electron transfer from Q_A^- to the secondary quinone acceptor Q_B . However, addition of EGTA or $CaCl_2$ to NaCl-washed PSII did not change the kinetics of fluorescence decay. Moreover, the kinetics of Q_A^- oxidation by Q_B in Ca-depleted PSII membranes obtained by treatment with citrate buffer at low pH (such treatment keep all extrinsic proteins in PSII but extracts Ca^{2+} from OEC) was not changed. The results obtained indicate that the effect of NaCl washing on the Q_A^- to Q_B electron transport is due to PsbP and PsbQ extrinsic proteins extraction, but not to Ca^{2+} depletion.

**ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ СТЕПЕНИ АГРЕГАЦИИ СВЕТОСОБИРАЮЩИХ
ПИГМЕНТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ АНТЕННАХ
ЗЕЛЕННЫХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ**
Variability of aggregation extent of light-harvesting pigments in peripheral
antennae of green photosynthetic bacteria

**Александра Таисова, Андрей Яковлев, Татьяна Черенкова,
Александр Арутюнян, Зоя Фетисова**

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

М.В.Ломоносова, 119991 Москва, Россия;

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

Основная цель этой работы – тестирование прогноза биологической целесообразности контролируемой светом роста степени агрегации пигментов в единичном строительном блоке хлоросомной светособирающей антенны зеленых фотосинтезирующих бактерий. С этой целью при комнатной температуре измеряли стационарные и дифференциальные фемтосекундные спектры поглощения, а также спектры кругового дихроизма. В качестве объектов использовали хлоросомы трех культур зеленой бактерии *Chloroflexus aurantiacus*, выращенных при различных интенсивностях света. Все перечисленные спектры хлоросом четко показали последовательный сдвиг Q_y -полосы БХл c в длинноволновую сторону при понижении интенсивности света роста культур. Одновременно наблюдалось сужение этих полос и увеличение их амплитуд. Проведена теоретическая оценка размеров агрегатов БХл c в единичных строительных блоках хлоросом, адаптированных к высокой и низкой интенсивностям света. Расчеты всех экспериментальных спектров проводили в рамках нашей модели, предложенной ранее [1, 2]. Модель предполагает, что единичный строительный блок хлоросомной БХл c антенны имеет форму цилиндрического агрегата, образованного шестью ($L=6$) одиночными/двойными экситон-связанными линейными цепями БХл c с плотностью упаковки, аппроксимирующей плотность *in vivo*. Теоретический расчет всех экспериментальных спектров показал, что количество пигментов в отдельной линейной цепи $N = 3-4$ и $N = 6$ для единичных строительных блоков БХл c антенны, адаптированных соответственно к высокой и низкой интенсивностям света роста культур. Таким образом, размер единичного строительного блока в хлоросомной ВChl c антенне *Cfx. aurantiacus* варьирует от $L \times N = 18-24$ до $L \times N = 36$ экситон-связанных молекул БХл c в зависимости от интенсивности света роста культур. Полученные данные продемонстрировали предсказанную нами ранее биологически целесообразную *вариабельность* степени агрегации пигментов периферических светособирающих антенн, *контролируемую* интенсивностью света роста культур.

1. Fetisova Z., Freiberg A., Mairing K., Novoderezhkin V., Taisova A., Timpmann K., *Biophys. J.*, 1996, 71, 995

2. Taisova A., Gülen D., Iseri E., Drachev V., Cherenkova T., Fetisova Z., 2001, *Photosynth. Res.*, 69, 9

ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ МОНОМЕРОВ И ТРИМЕРОВ ФОТОСИСТЕМЫ I ЦИАНОБАКТЕРИИ *Arthrospira platensis*

И. В. Терехова, Ю. В. Большевцева

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Ленинский проспект, 33, корп.2, 119071, Россия. E-mail: terekhova@inbi.ras.ru; тел: +7-495-954-14-73; Fax: +7-495-954-27-32

Одной из важных задач современной науки является создание искусственных систем, способных превращать энергию солнца в энергию химических связей водорода [1] или генерировать фототок и превращаться в чувствительные фотосенсоры [2]. В такие системы в качестве преобразователя энергии часто внедряют пигмент-белковые комплексы фотосистемы I (пбк ФСI) цианобактерий [1, 2]. В тилакоидных мембранах цианобактерий пбк ФСI существуют преимущественно в виде тримеров, но также и мономеров [3]. В связи с этим представляет интерес исследование устойчивости тримеров и мономеров ФСI к различным условиям среды, например, к изменению температуры, освещения и др. В настоящей работе исследовали изменение активности реакционного центра ФСI (P700) тримеров и мономеров цианобактерии *Arthrospira platensis* в зависимости от повышения температуры. Об активности P700 судили по фотоиндуцированному изменению поглощения при 810 нм (против 870 нм), которое регистрировали при помощи РАМ-101 с использованием двухволновой приставки ED-P700DW (“Walz”, Германия) в присутствии донора электронов аскорбата натрия (ascNa) или с донорно-акцепторной системой ascNa – DCPIP (дихлорфенолиндофенол) в присутствии метилвиологена (MV). В результате исследований было обнаружено, что при измерении фотоиндуцированного изменения поглощения P700 в системе ascNa – DCPIP (дихлорфенолиндофенол) в присутствии метилвиологена (MV) потеря активности на 50% наблюдалась при одной и той же температуре у тримеров и мономеров ФСI (~83°C). В присутствии только ascNa у тримеров ФСI 50%-ная потеря активности P700 наблюдалась примерно при 93°C при выдерживании образца в течение 3-х минут, тогда как у мономеров такое же снижение активности наблюдалось примерно при 83°C. Таким образом, при воздействии высоких температур тримерная организация пбк ФСI сохраняет более высокую стабильность белковых и пигментных компонентов, чем структурная организация мономеров, что способствует сохранению активности реакционных центров P700 тримеров при более высоких температурах по сравнению с активностью P700 мономеров. Одинаковое уменьшение амплитуды сигнала при фотоокислении P700 в системе ascNa – DCPIP с MV у тримеров и мономеров в зависимости от нагревания может наблюдаться вследствие ускорения восстановления P700⁺ промежуточным переносчиком электронов DCPIP при повышении температуры.

1. Iwuchukwu I. J., Vaughn M., Myers N., O'Neill H., Frymier P., Bruce B. D., *Nature Nanotechnology*, 2010, 5 (1), 73.
2. Terasaki N., Yamamoto N., Tamada K., Hattori M., Hiraga T., Tohri A., Sato I., Iwai M., Taguchi Sh., Enami I., Inoue Y., Yamanoi Y., Yonezawa T., Mizuno K., Murata M., Nishihara H., Yoneyama S., Minakata M., Ohmori T., Sakai M., Fujii M., *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, 1767 (11), 653.
3. Rögner M., Mühlhoff U., Boekema E. J., Witt H. T., *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, 1015 (3), 415.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭКСИТОННЫХ СОСТОЯНИЙ АНТЕННЫ CP26 ФОТОСИСТЕМЫ II В ПОЛЯРИЗУЕМОЙ БЕЛКОВОЙ СРЕДЕ Modeling of the exciton states of the CP26 antenna from photosystem II in polarizable protein medium

Даниил Хохлов, Александр Белов

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия
E-mail: daniilkh@yahoo.com; Tel: +7-495-939-12-86

Комплекс CP26, принадлежащий к семейству белков Lhcb, представляет собой одну из периферических антенн фотосистемы II высших растений и выполняет двоякую роль в процессах переноса энергии электронного возбуждения. Он связывает поглощающие свет тримерные комплексы LHCP с ядром фотосистемы, а в условиях избыточного освещения может участвовать в диссипации энергии. Таким образом, интерес представляет исследование возможных путей переноса энергии и ролей пигментов. Для теоретического изучения процесса переноса энергии необходимо корректно описывать энергии пигментов и экситонные взаимодействия в комплексе. В качестве подтверждения корректности модели могут служить спектральные свойства комплекса, которые могут быть получены из экситонного гамильтониана системы пигментов.

В данной работе диагональные элементы гамильтониана были получены как энергии возбуждения пигментов, полученные методом QM/MM. В квантовую подсистему был включен отдельный хлорофилл, для расчета использовали TD-DFT с функционалом CAM-B3LYP, хорошо показавшим себя для моделирования порфиринов. Остальной комплекс и ближайшие молекулы воды описывали с помощью поляризуемого силового поля AMBER02. Недиагональные элементы (энергии экситонного взаимодействия) рассматривали как взаимодействие точечных зарядов, аппроксимирующих потенциал перехода (TrESP). Уширения спектральных линий были получены с использованием теории Редфилда, в рамках которой было учтено уширение, вызванное как взаимодействием с белком, так и релаксацией экситонных состояний.

На основе этого подхода были смоделированы спектры поглощения, кругового и линейного дихроизма. Полученные спектры демонстрируют хорошее количественное согласие с экспериментальными данными как по положению и интенсивности пиков, так и по форме спектральных линий. Также рассмотрена структура экситонных состояний комплекса, среди которых существуют состояния, локализованные одновременно на пигментах разных типов и, соответственно, участвующие в переносе с хлорофиллов *a* на *b*. В структуре комплекса выделены блоки сильно взаимодействующих пигментов, перенос энергии между которыми имеет наибольшую скорость.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-03-00736).

**НАЧАЛЬНЫЕ СТАДИИ РАЗДЕЛЕНИЯ ЗАРЯДОВ В МУТАНТНЫХ
РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ *Rhodobacter sphaeroides*
С МОДИФИЦИРОВАННЫМ РЕДОКС-ПОТЕНЦИАЛОМ
ПЕРВИЧНОГО ДОНОРА ЭЛЕКТРОНА**

**Initial stages of charge separation in mutated reaction centers of
Rhodobacter sphaeroides with modified redox potential of primary electron donor**

Антон Христиц, Антон Хмельницкий, Мария Леонова, Владимир Шувалов

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Московская область,
142290, Россия
E-mail: anmaster84@ya.ru

Методом фемтосекундной абсорбционной дифференциальной спектроскопии проведены сравнительные исследования первичного разделения зарядов в реакционных центрах (РЦ) *Rba. sphaeroides* дикого типа и мутантов с модифицированным редокс-потенциалом первичного донора электрона Р при криогенной температуре (~100 К). В работе использовали серию одиночных, двойных и тройного мутантных РЦ, в которых потенциал окисления Р был увеличен за счет образования водородных связей между функциональными группами димера Р и вновь введенными остатками гистидина в положениях М160, L131 и М197. Первичный хинонный акцептор Q_A в РЦ был химически предвосстановлен дитионитом натрия. Показано, что в мутантных РЦ с потенциалом окисления первичного донора электрона Р, смещенным относительно потенциала в РЦ дикого типа на величину от +60 до +205 мВ, образуется состояние $P^+V_A^-$, что наблюдается по регистрации маркерной полосы поглощения анион-радикала V_A^- при 1025 нм. Интенсивность полосы при 1025 нм варьировала для разных образцов мутантных РЦ. В РЦ мутанта с максимальным сдвигом редокс-потенциала Р на +260 мВ состояние $P^+V_A^-$ не регистрируется. Сделано предположение, что помимо влияния использованных точечных мутаций в позициях М160, L131 и М197 на редокс-потенциал Р/ P^+ , введенные мутации могут оказывать неспецифическое влияние на редокс-потенциал молекулы V_A и, соответственно, на положение уровня энергии состояния $P^+V_A^-$. Совокупное воздействие этих факторов (в комбинации с возможным электростатическим эффектом заряда Q_A^- на свободную энергию состояний с разделенными зарядами), по-видимому, в значительной степени определяет взаимное расположение энергетических уровней состояний P^+ и $P^+V_A^-$, влияя на термодинамическую доступность уровня $P^+V_A^-$ для заселения из возбужденного состояния P^* .

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №16-34-00829

**ФЕМОТОСЕКУНДНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕРВИЧНЫХ ПРОЦЕССОВ,
ПРОТЕКАЮЩИХ В РЕАКЦИОННОМ ЦЕНТРЕ ФОТОСИСТЕМЫ 1,
ПРИ ВОЗБУЖДЕНИИ В ПОЛОСУ ПОГЛОЩЕНИЯ
Femtosecond researches of primary processes in reaction center of photosystem 1
in excitation in Q_y**

**Иван Шелаев¹, Федор Гостев¹, Анастасия Петрова², Махир Мамедов²,
Алексей Семенов², Виктор Надточенко¹, Дмитрий Черепанов¹**

1 – Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва, 119991, Россия;
E-mail: shelaev@bk.ru; Fax: +7(499)1378357
2 – Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ, Москва,
119992, Россия

Процесс переноса электрона в фотосистеме 1 (ФС1) в последние годы 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 в близкой спектральной области. В данной работе предложен новый подход селективного возбуждения РЦ ФС1, позволивший наблюдать процесс разделения зарядов в ФС1 в фемтосекундном масштабе времен.

Исследования фемтосекундной динамики первичных процессов в ФС1 цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 были проведены методом фемтосекундной абсорбционной спектроскопии «возбуждение-зондирование». С помощью амплитудно-фазового модулятора, позволяющий «отрезать» синий край спектра возбуждающего фемтосекундного импульса при 760 нм, был определен красный конец спектра поглощения ФС1. Так же впервые было показано, что спад поглощения ФС1 в красной области описывается экспоненциальной зависимостью, что уникально для биологических объектов.

В ходе исследования было показано, что при возбуждении ФС1 фемтосекундным импульсом при 760 нм и длительностью 30 фс возбуждается непосредственно РЦ. При этом наблюдается сверхбыстрое разделение зарядов с образованием первой ион-радикальной пары $P_{700}^+A_0^-$ за 100–150 фс.

Была исследована зависимость фемтосекундной динамики ФС1 от энергии возбуждающего импульса и показано, что линейная составляющая (при $E < 200$ нДж) совпадает с фемтосекундной динамикой ФС1 при возбуждении импульсом при 720 нм, полученной нами ранее.

На основе экспериментальных данных предложена модель с тремя возбужденными состояниями, позволяющая описать и сверхбыстрое разделение зарядов, и экспоненциальную зависимость спада красного края спектра поглощения ФС1.

Работа поддержана грантами РФФИ №14-14-00789 и РФФИ №17-04-01717.

**ФЕМТОСЕКУНДНАЯ РЕЛАКСАЦИЯ ЭНЕРГИИ В
РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ *Rhodobacter sphaeroides***
Femtosecond energy relaxation in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*

Андрей Яковлев¹, Владимир Шувалов^{1,2}

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

Будучи первичным донором электронов, димер бактериохлорофилла Р играет ключевую роль в физической стадии фотосинтеза пурпурной бактерии *Rhodobacter (Rba.) sphaeroides*. В ряде работ обсуждается возможность первичного разделения зарядов внутри Р. На это может указывать сильный сдвиг электронной плотности от Р_А к Р_В (в отношении 0.24/0.76) в возбужденном состоянии Р* согласно расчетам молекулярных орбиталей [1]. Фемтосекундная спектроскопия РЦ *Rba. sphaeroides* в среднем ИК диапазоне (1000–1600 см⁻¹) показала, что электронная структура Р* изменяется за время около 200 фс [2]. Было предположено, что причиной этого изменения является внутримолекулярное разделение зарядов в Р*. Когерентная спектроскопия нативных и мутантных РЦ *Rba. sphaeroides* с разрешением 40 фс в ближней ИК области выявила сложную динамику спектров ΔА, которая может быть интерпретирована в пользу формирования смешанного состояния с разделенными зарядами Р*(Р_А^{δ+}Р_В^{δ-}) [3].

В настоящей работе с помощью дифференциальной фемтосекундной спектроскопии исследована релаксация энергии в реакционных центрах (РЦ) мутанта YM210L фотосинтезирующей бактерии *Rba. sphaeroides* при низкой температуре (90 К). Обнаружен динамический сдвиг вынужденного излучения возбужденного состояния димера бактериохлорофилла Р* в длинноволновую сторону, который начинается одновременно с формированием Р* и сопровождается изменением формы спектра этого излучения. Характерная величина этого сдвига составила около 30 нм, а характерное время – около 200 фс. В дифференциальных кинетиках ΔА, измеренных при фиксированных длинах волн, фемтосекундный сдвиг вынужденного излучения Р* проявляется в виде зависимости этих кинетик от длины волны. Показано, что найденный длинноволновый сдвиг согласуется с представлениями об электронно-колебательной релаксации возбужденного состояния Р*, если принять константы времени колебательной и электронной релаксации равными 100 и 50 фс, соответственно. Обсуждаются такие альтернативные механизмы динамического сдвига спектра вынужденного излучения Р*, как перераспределение энергии между колебательными модами и когерентное возбуждение мод.

1. Plato, M., Lenzian, F., Lubitz, W., and Möbius, K. (1992) In: *The Photosynthetic Bacterial Reaction Center II: Structure, Spectroscopy, and Dynamics* (Breton, J., and Verméglio, A., eds.) Plenum, New York, pp 109–118.

2. Hamm, P., and Zinth, W. (1995) *J. Phys. Chem.* **99**, 13537–13544.

3. Khatypov, R. A., Khmel'nitskiy, A. Yu., Khrustin, A. M., Fufina, T. Yu., Vasilieva, L. G., and Shuvalov, V. A. (2012) *Biochim. Biophys. Acta* **1817**, 1392–1398.

СЕКЦИЯ 2. РЕГУЛЯЦИЯ ФОТОСИНТЕЗА

**КАРОТИНОИДЫ СВЕТОСОБИРАЮЩИХ КОМПЛЕКСОВ
СЕРНЫХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ**
Carotenoids of light-harvesting complexes of sulfur photosynthetic bacteria

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

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пушкино, Московская область,
142290, Россия;
E-mail: AshikhminAA@gmail.com; Fax: +7(4967)330532

У пурпурных бактерий кроме бактериохлорофилла (БХл) фотосинтезирующий аппарат содержит различные каротиноиды, которые обычно называют дополнительными или вспомогательными пигментами фотосинтеза. Они поглощают видимый свет в области ~430–570 нм, где БХл имеет минимальное поглощение. Несмотря на то, что уже определены основные функции каротиноидов (светособирающая, защитная и структурная), остается много вопросов об участии каротиноидов в сборке светособирающих комплексов, а также влиянии структуры этих комплексов на функционирование каротиноидов.

В докладе будут обобщены результаты по изучению встраивания отдельных каротиноидов в светособирающие комплексы LH2 из пурпурных серных бактерий *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* и *Allochromatium minutissimum*. Полученные данные расширяют представление о взаимосвязи структурных особенностей каротиноидов и их функционировании в комплексах LH2.

Будут рассмотрены следующие вопросы: 1. Организация светособирающих комплексов LH2. 2. Функции каротиноидов в бактериальном фотосинтезе. 3. Встраивание отдельных каротиноидов в светособирающие комплексы LH2 и свойства комплексов со встроенными каротиноидами. 4. Способность некоторых каротиноидов на сине-зеленом свету участвовать в фотоокислении БХл и образовании активных форм кислорода.

Работа выполнена при частичной поддержке грантов РФФИ (15-04-02660а, 17-04-00929а), а также гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (МК-187.2017.4).

РЕГУЛЯЦИЯ ФОТОСИНТЕЗА ПРИ УЧАСТИИ ПОТОКА ЦИТОПЛАЗМЫ Regulation of photosynthesis mediated by cytoplasmic streaming

Александр А. Булычев, Анна В. Комарова, Андрей Б. Рубин

Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, 119234, Россия;
E-mail: bulychev@biophys.msu.ru; Fax: +7-495-939-11-15

В структуре харовых водорослей присутствуют клетки с размерами от нескольких сантиметров до 10–20 см. Диффузия субстратов и сигнальных молекул на такие дальние дистанции крайне неэффективна. Перенос веществ и везикул на протяженные расстояния, необходимый для интеграции клеточных процессов, осуществляется благодаря быстрому (до 100 мкм/с) движению цитоплазмы. Вследствие больших размеров интернодальные клетки в среде обитания часто подвержены действию неравномерного и флуктуирующего освещения. Применение микрофлуориметра с импульсно модулированным освещением и тонкого световода, помещаемого на заданные расстояния от анализируемого участка клетки, позволило выявить дистанционный механизм фоторегуляции фотосинтеза и дальнедействующие взаимодействия неподвижных хлоропластов, опосредованные переносом сигнала с потоком цитоплазмы из ярко освещенных участков в область затенения [1–3]. Локальное освещение участка клетки (белый свет, 30 с, 500 мкЕ м⁻² с⁻¹) на удалении $d = 1–5$ мм от места измерения в условиях слабой фоновой подсветки всего междоузлия (~9 мкЕ м⁻² с⁻¹) приводит к переходному возрастанию флуоресценции хлоропластов F' после латентного периода, длительность которого линейно возрастает с расстоянием d . Волна изменений F' в выбранной плоскости наблюдения в ответ на локальное освещение, распространяется только в направлении потока жидкости. Замедление потока цитоплазмы с помощью цитохалазина D вызывает задержку возникновения и уширение переходных изменений F' , индуцируемых освещением удаленного участка. Непродолжительная (~30 с) остановка течения жидкости после генерации потенциала действия сопровождается затягиванием фронта нарастания или спада F' в зависимости от места нахождения «облученной» цитоплазмы на момент стимуляции. Опосредованная циклозом передача сигнала обратимо инактивируется после темновой адаптации и подавляется агентами, нарушающими поток электронов в акцепторной части ФС1. Установлены зависимости изменений F' от интенсивности общей фоновой подсветки и локального луча. Показано, что процесс генерации–восприятия фотоиндуцированных сигналов проявляется по-разному в участках клетки с высокой активностью Н⁺-насоса плазмалеммы и в зонах со встречно направленным пассивным потоком Н⁺. Предположено, что дальние взаимодействия неподвижных хлоропластов опосредованы экспортом триозофосфатов и восстановительных эквивалентов в зоне яркого освещения, переносом этих метаболитов в потоке цитоплазмы, их поступлением в хлоропласты затененных участков, повышением содержания NADPH в строме и последующим восстановлением пула пластохинонов и хинонного акцептора Q_A в фотосистеме II.

1. Bulychov A. A., Alova A. V., Rubin A. B., *Eur Biophys J.*, 2013, 42, 441
2. Bulychov A. A., Komarova A. V., *Biochim. Biophys. Acta*, 2015, 1847, 379
3. Bulychov A. A., Komarova A. V., *Biochim. Biophys. Acta*, 2017, 1858, 386

ИССЛЕДОВАНИЕ STATE TRANSITIONS В ЛИСТЬЯХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ РАЗЛИЧНЫХ ПОДХОДОВ Evaluation of state transitions in leaves of higher plants by various techniques

Дарья Ветошкина, Марина Козулева, Борис Иванов,
Мария Борисова-Мубаракшина

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пушкино, Московская область,
142290, Россия
E-mail: vetoshkina_d@mail.ru

Изменения состояния антенны фотосистем (state transitions) были исследованы в листьях растений арабидопсиса дикого типа и мутантных растений с заблокированным синтезом STN7 киназы, а также в листьях ячменя, инкубированных в присутствии NaF, ингибитора фосфатаз. В состоянии 1 тримеры собирающей антенны ФС2 связаны с ФС2, а в состоянии 2 – с ФС1. В отсутствие STN7 киназы в растениях арабидопсиса процесс state transitions не протекает, т. е. на свету не происходит перехода из состояния 1 в состояние 2. При инкубации листьев ячменя с NaF переход из состояния 1 в состояние 2 при освещении происходит, однако не происходит возвращения фотосинтетического аппарата из состояния 2 в состояние 1 в темноте, т. е. возвращения антенных комплексов к ФС2.

В листьях арабидопсиса дикого типа и мутантных растений арабидопсиса, также как и в листьях ячменя, инкубированных в присутствии и в отсутствие NaF, оценку state transitions по релаксации нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла a после освещения светом низкой интенсивности в течение 5, 10 и 20 минут сопоставляли с оценкой этого процесса, полученной с помощью измерений спектров низкотемпературной флуоресценции хлорофилла a . В тех же условиях измеряли уровень накопления фосфорилированных белков Lhcb1 и Lhcb2 в листьях арабидопсиса и ячменя после 5, 10 и 20 минут освещения светом низкой интенсивности. Было показано, что для полного протекания перехода из состояния 1 в состояние 2 необходимо 20 минут освещения листьев растений обоих видов.

Анализ данных, полученных с помощью трех различных подходов оценки state transitions выявил отличия в протекании данного процесса в разных видах растений при изменении интенсивности действующего света: у растений арабидопсиса state transitions протекает при низкой интенсивности света и ингибируется при увеличении интенсивности света до 300 мкмоль квантов/м²с, в то время как в листьях ячменя процесс state transitions происходит даже при интенсивности света 600 мкмоль квантов/м²с. Только при увеличении интенсивности света выше 600 мкмоль квантов/м²с в листьях ячменя процесс state transitions отсутствовал.

Полученные результаты показывают, что для разных видов растений существуют различные критические интенсивности света, при которых процесс state transitions перестает происходить.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, проект № 14-14-00535.

ИССЛЕДОВАНИЕ УЧАСТИЯ В ФОТОСИНТЕЗЕ ДВУХ

АЛЬФА-КАРБОНАГИДРАЗ АРАБИДОПСИСА

Participation in photosynthesis of two alpha-carbonic anhydrases of *Arabidopsis*

Елена Журикова, Людмила Игнатова, Борис Иванов

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

E-mail: zhurikova.alena@yandex.ru

Карбоангидраза (КА) – цинксодержащий фермент, который катализирует обратимую гидратацию углекислого газа. В тилакоидных мембранах хлоропластов высших растений была обнаружена альфа-КА4 [1]; также в тилакоидах, по нашим данным, расположена альфа-КА2 [2].

Роль этих КА в фотосинтезе исследовали, сравнивая характеристики фотосинтеза растений *Arabidopsis thaliana*, нокаутированных по гену *At4g20990*, кодирующему альфа-КА4 и по гену *At2g28210*, кодирующему альфа-КА2, с характеристиками растений дикого типа (ДТ). Растения выращивали при 8-часовом освещении светом интенсивностью 100 мкмоль квантов/м²с при концентрации CO₂ 450 ppm. Параметры фотосинтеза измеряли на свету интенсивностью 500 мкмоль квантов/м²с при концентрации CO₂ 700–800 ppm.

Измерения КА активности фрагментов тилакоидных мембран растений ДТ и мутантов показали, что альфа-КА4 находится вблизи фотосистемы 2. Было обнаружено, что в мутантах по альфа-КА4 энергозависимый компонент нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* (НФХТФХ) был ниже, а в мутантах по альфа-КА2 – выше, чем в растениях ДТ. Эффективные квантовые выходы ФС2 и ФС1, измеренные при стационарном фотосинтезе, в мутанте по альфа-КА4 были выше и ниже, соответственно, а в мутанте по альфа-КА2 наоборот – ниже и выше, чем в растениях ДТ. В листьях мутантов по альфа-КА4 светоиндуцируемое накопление пероксида водорода было в 1,5–2 раза выше, а в мутанте по альфа-КА2 несколько ниже, чем в растениях ДТ.

Учитывая расположение альфа-КА4, предполагается, что эта КА участвует в поставке протонов PsbS белку, регулируя энергозависимое НФХТФХ. Кроме того, большее светоиндуцируемое накопление H₂O₂ и меньшая скорость ассимиляции CO₂ по сравнению с растениями ДТ [2] предполагают, что в мутанте по альфа-КА4 увеличивается перенос электронов из фотосинтетической электрон-транспортной цепи к O₂ и уменьшается образование НАДФН, т. е. происходит перераспределение потоков электронов на акцепторной стороне ФС1. На основе данных об увеличении в отсутствие альфа-КА2 энергозависимого НФХТФХ в докладе обсуждены возможные механизмы влияния этой КА на накопление протонов в люмене тилакоидов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 15-04-03883.

1. Friso, G., Giacomelli, L., Ytterberg, A. J., Peltier, J. B., Rudella, A., Sun, Q., and van Wijk, K. J., *The Plant Cell*, 2004, 16(2), 478
2. Журикова Е. М., Игнатова Л. К., Руденко Н. Н., Мудрик В. А., Ветошкина Д. В., Иванов Б. Н., *Биохимия*, 2016, 81 (10), 1463

ОБРАЗОВАНИЕ В ТИЛАКОИДНОЙ МЕМБРАНЕ, ВЫХОД ИЗ ХЛОРОПЛАСТОВ И СИГНАЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ H₂O₂

Formation of H₂O₂ in thylakoid membrane, its outflow from chloroplasts, and signal function

Борис Иванов, Марина Козулева, Илья Найдов, Дарья Ветошкина, Мария Борисова-Мубаракшина

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино, 142290, Россия

E-mail: ivboni@rambler.ru

В фотосинтетических электронтранспортных цепях (ФЭТЦ) в аэробных условиях неизбежно происходит восстановление молекул O₂ (реакция Мелера), скорость которого и доля в общем переносе электронов зависят от вида растения, фазы развития и условий окружающей среды [1]. Первый стабильный продукт восстановления O₂ – перекись водорода, H₂O₂. Часть молекул H₂O₂ образуется в тилакоидных мембранах хлоропластов, и при увеличении интенсивности действующего света увеличение образования H₂O₂ происходит, в основном, за счет такого образования [2, 3]. Это согласуется с генерацией внутри мембраны супероксидных анион-радикалов, O₂⁻, первичных продуктов восстановления молекул O₂ в ФЭТЦ; причем вклад данного процесса растет с увеличением интенсивности света [3, 4]. Теоретические расчеты и экспериментальные результаты показывают, что H₂O₂ в мембране образуется в реакции O₂⁻ с молекулами пласто-гидрохинона [5, 6, 7]. Найдено, что молекулы H₂O₂, образовавшиеся в хлоропластах на свету, выходят из них через аквапорины [8]. Предполагается, что выход из хлоропластов в условиях достаточной емкости стромальной системы их нейтрализации способны молекулы H₂O₂, образовавшиеся в тилакоидной мембране. Установлено, что H₂O₂ служит инициатором приспособительных изменений пигментного аппарата ФЭТЦ при адаптации к долговременному увеличению интенсивности действующего света [9].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 14-14-00535.

1. Иванов Б. Н., Хоробрых С. А., Козулева М. А., Борисова-Мубаракшина М. М. В кн. «Современные проблемы фотосинтеза». Изд-во МГУ им. М. В. Ломоносова (Москва), 2014, т. 1, стр. 407–460
2. Mubarakshina M., Khorobrykh S., Ivanov B., *BBA*, 2006, 1757, 1496–1503
3. Mubarakshina M., Kozuleva M., Rudenko N., Naydov I., Klenina I., Ivanov B., *BBA*, 2012, 1817, 1314–1321
4. Kozuleva M., Klenina I., Proskuryakov I., Kirilyuk I., Ivanov B., *FEBS Lett.*, 2011, 585, 1067–1071
5. Khorobrykh S., Mubarakshina M., Ivanov B., *BBA*, 2004, 1657, 164–167
6. Ivanov B., Mubarakshina M., Khorobrykh S., *FEBS Lett.*, 2007, 581, 1342–1346
7. Vetoshkina D., Ivanov B., Proskuryakov I., Borisova-Mubarakshina M. *Physiologia Plantarum*, 2017, doi: 10.1111/ppl.12560
8. Mubarakshina M. M., Ivanov B., Naydov I. A., Hillier W., Badger M., Krieger-Liszka A., *J. Exp. Botany*, 2010, 61, 3577–3587
9. Borisova-Mubarakshina M., Ivanov B., Vetoshkina D., Lubimov V., Fedorchuk T., Naydov I., Kozuleva M., Rudenko N., Dall'Osto L., Cazzaniga S., Bassi R., *J. Exp. Botany*, 2015, 66, 7151–7164

**ВЛИЯНИЕ НАЛИЧИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА
В АТМОСФЕРЕ НА ЭВОЛЮЦИЮ ФОТОСИСТЕМЫ I**
Effect of atmospheric molecular oxygen on evolution of Photosystem I

Марина Козулева^{1,2*}, Kevin E. Redding³, Iftach Yacoby¹, Борис Иванов²

1 – School of Plant Sciences and Food Security, The George S. Wise Faculty of Life Sciences, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel

2 – Институт Фундаментальных Проблем Биологии РАН, Пушкино, Московская область, 142290, Россия

3 – Department of Chemistry and Biochemistry and Center for Bioenergy and photosynthesis, Arizona State University, Tempe, USA

* E-mail: kozuleva@gmail.com

Появление кислородного фотосинтеза привело к появлению кислородной атмосферы, жизнь при которой стала вызовом для живых организмов, и в том числе – для фотосинтезирующих. Взаимодействие молекул O_2 с компонентами фотосинтетического аппарата приводит к появлению активных форм кислорода и уменьшению квантового выхода фотосинтеза. Эволюция фотосинтетического аппарата шла в направлении уменьшения вероятности реакций с кислородом. Одной из таких реакций является одноэлектронное восстановление кислорода компонентами фотосинтетической электрон-транспортной цепи (первичная стадия реакции Мелера). При высокой интенсивности света и/или ограниченном фотовосстановлении НАДФ⁺ такое восстановление кислорода происходит прежде всего на акцепторной стороне фотосистемы I, и эта реакция представляет собой запасной путь электронного транспорта, предохраняющий цепь от перевосстановления, т. е. в определенных условиях перенос электронов к кислороду оказывается выгодным фотосинтезирующему организму. В докладе на основе современных данных о механизмах восстановления кислорода на акцепторной стороне фотосистемы I и о строении и функционировании этой фотосистемы будут рассмотрены представления о том, как кислород мог повлиять на эволюцию реакционных центров первого типа и на возникновение современной фотосистемы I.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ №17-14-01371

**ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО
АППАРАТА ЯЧМЕНЯ, ВЫРАЩЕННОГО НА
УЗКОПОЛОСНОМ КРАСНОМ И СИНЕМ СВЕТУ**

**Галина Кочетова, Ольга Беляева, Татьяна Власова, Дарья Горшкова,
Елизавета Бассарская, Татьяна Жигалова, Ольга Аверчева**

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова. Ленинские горы, 1, Москва, Россия

E-mail: belyaeva0104@gmail.com; телефон: +7(495)939-54-89

Особенности организации фотосинтетического аппарата ячменя при его выращивании на узкополосном красном и синем свете (фотодиоды с эмиссией 660 и 450 нм) исследовали с помощью электронной микроскопии и низкотемпературной флуоресцентной спектроскопии. Контролем служили растения, выращенные на белом свете флуоресцентных ламп. Обнаружено, что ультраструктура хлоропластов растений ячменя, выращенных под синим светом, была практически идентична ультраструктуре хлоропластов контрольных растений. Ультраструктура хлоропластов растений, выращенных под красным светом, существенно отличалась от ультраструктуры хлоропластов контрольных растений: наблюдалось увеличение общего количества мембран в хлоропластах, протяженности стекинг-зоны тилакоидов без четкой их организации в граны. После 5-часового периода темноты в контроле происходили заметные изменения: увеличивалось количество стромальных тилакоидов, что сокращало свободное стромальное пространство, люменальное пространство заметно увеличивалось. В то же время ультраструктура хлоропластов растений, выращенных под синим и красным светом, не изменялась после затемнения растений. Следовательно, динамичность мембранной архитектуры хлоропластов растений красного и особенно синего вариантов была снижена по сравнению с контролем. Исследование низкотемпературных спектров флуоресценции (77 К) гомогенатов из листьев ячменя показало, что отношение полос F741/F683, отражающее распределение световой энергии между фотосистемой 1 (F741) и фотосистемой 2 (F683), одинаково для контрольных растений и растений, выращенных на синем свете. Растения, выращенные на красном свете, отличались увеличенным на 25–30% отношением F741/F683, что можно объяснить наблюдаемыми у этого варианта особенностями структурной организации хлоропластов, которые могут обеспечивать сближение двух фотосистем, приводящее к увеличению миграции энергии с ФС2 на ФС1, а также к облегчению перемещения ЛНСII к ФС1. После затемнения растений наблюдались практически одинаковые для всех трех вариантов (контроль, красный свет, синий свет) изменения низкотемпературных спектров возбуждения флуоресценции ФС1 (эмиссия при 735 нм): снижение интенсивности синей и красной полос и смещение красной полосы (674–675 нм) на 2 нм в длинноволновую сторону. Такое изменение спектра возбуждения (поглощения) характерно для ухода мобильной антенны ЛНСII от ФС1. Следовательно, изменения спектров возбуждения ФС1, также как падение F741/F683 при затемнении растений, свидетельствуют о том, что на свету часть пула мобильного ЛНСII ассоциирована с ФС1 независимо от спектрального состава освещения, что подтверждает данные других исследователей об универсальности ассоциации ЛНСII с ФС1.

**ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА КАК ИНДЕКС
УСТОЙЧИВОСТИ ИНВАЗИОННЫХ РАСТЕНИЙ К
СТРЕССОРНЫМ АБИОТИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ**
**Chlorophyll fluorescence as the index of invasive plants resistance to abiotic
stressors**

**Александр Лукаткин, Евгений Тютяев, Эльвера Шаркаева, Андрей
Лукаткин, Ольга Ведяшкина, Екатерина Лизунова**

Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва. Большевикская ул.,
д. 68, Саранск, 430005, Россия
E-mail: aslukatkin@yandex.ru Тел./факс: +7(8342)322507, +7(8342)324554

Известно, что параметры флуоресценции хлорофилла *a* в листьях фотосинтезирующих организмов весьма чувствительны к изменениям окружающей среды, в связи с чем могут использоваться в качестве неповреждающих маркеров стрессового ответа растения. В настоящее время во всем мире остро стоит проблема повсеместного внедрения инвазивных видов, т. е. видов, чужеродных для местных экосистем. Попадая в новые для себя условия, инвазивные виды интенсивно распространяются, вытесняя аборигенные виды. Одним из факторов высокой инвазивной способности чужеродных видов может быть устойчивость к абиотическим факторам окружающей среды. В работе исследовали реакцию на абиотические факторы в листьях двух видов древесных (*Acer negundo* L., *Fraxinus pennsylvanica* Marsh.) и двух видов травянистых (*Conyza canadensis* L., *Echinocystis lobata* (Michx.) Torr. et Gray) инвазивных растений. 45–60-дневные растения, выращенные в почвенной культуре, подвергали действию абиотического стресса, в качестве которого выступали три фактора: высокая (40°C) и низкая (4°C) температура (растения выдерживали в течение 6 ч) и засуха (растения выдерживали 2 суток без полива). Оценку реакции растений на мягкие стрессовые воздействия проводили регистрацией индукции замедленной флуоресценции хлорофилла *a* на флуориметре Junior PAM (Germany) после 30-минутной адаптации растений к темновым условиям.

Установлено, что четыре инвазивных растения показывали несколько различающиеся изменения флуоресценции хлорофилла в ответ на высокие/низкие температуры и засуху. Обычно при стрессах отмечалось уменьшение фотохимического тушения флуоресценции хлорофилла (кроме *F. pennsylvanica* после действия пониженных температур), при этом нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла возрастало в листьях древесных растений в ответ на действующие факторы (кроме засухи). Эти эффекты связаны с ингибированием активности ФС2, обусловленным частичным восстановлением пула хинонов. Напротив, увеличенная активность ФС2 и подавленное нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла в листьях *C. canadensis* наблюдалась лишь в ответ на воздействие высоких температур. Возможно, это было результатом увеличения окисленности пула хинонов, которое способствовало активации электронного транспорта между двумя фотосистемами. Стоит отметить, что по изменениям параметров флуоресценции хлорофилла оба вида травянистых растений показали более высокую толерантность к засухе относительно древесного вида *F. pennsylvanica*. Различные ответы фотосинтетического аппарата при действии абиотического стресса могут лежать в основе разной стратегии инвазивных растений при освоении новых местообитаний.

**ВСТРАИВАНИЕ ЛИКОПИНА В АНТЕННЫЕ КОМПЛЕКСЫ
ПУРПУРНЫХ СЕРНЫХ БАКТЕРИЙ**
Embedding lycopene into antenna complexes of purple sulfur bacteria

**Зоя Махнева, Зинаида Журавлёва, Александр Ашихмин,
Андрей Москаленко**

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пушкино, Московская область,
142290, Россия;
E-mail: zmakhneva45@rambler.ru; Fax: +7(4967)330532

Светособирающие комплексы фотосинтезирующих бактерий эффективно поглощают световую энергию и переносят её в виде энергии электронного возбуждения к реакционным центрам (RC), в которых эта энергия запасается в форме разделения зарядов. У пурпурных бактерий выделяют два типа светособирающих комплексов, согласно их расположению, относительно RC: прицентровые антенные комплексы (LH1) и периферийные антенные комплексы (LH2). Комплекс LH1 окружает RC и образует с ним ядерный (core) комплекс LH1-RC, вокруг которого в мембране располагаются комплексы LH2. Комплексы LH1 и LH2 построены из α - и β -полипептидных цепей, молекул бактериохлорофилла (БХл) и каротиноидов.

Данная работа посвящена получению модифицированных по каротиноидному составу пигмент-белковых комплексов LH2. Объектами исследования были пурпурные серные бактерии *Ectothiorhodospira (Ect.) haloalkaliphila* и *Allochromatium (Alc.) minutissimum*, у которых конечным продуктом биосинтеза каротиноидов является спириллоксантин. В клетках этих бактерий естественное содержание каротиноидов было уменьшено на $\geq 95\%$ с помощью ингибитора каротиноидгенеза – дифениламина. В мембраны указанных бактерий был встроен ликопин, который был получен из томатной пасты. Из мембран обеих культур выделены комплексы LH2 с модифицированным каротиноидным составом. По нашим оценкам эффективность встраивания ликопина составила 80–90%. Изучены ряд физико-химических характеристик полученных комплексов LH2 (поглощение, возбуждение флуоресценции, круговой дихроизм, фотоустойчивость). Установлено, что встраивание ликопина не изменяло основных спектральных характеристик комплексов LH2 в ближней ИК-области. По сравнению с бескаротиноидными комплексами, в модифицированных комплексах LH2 была обнаружена оптическая активность ликопина, что подтверждает его встраивание в структуру комплекса LH2. Показано, что при облучении комплексов LH2 светом, поглощаемым каротиноидами, встроенный ликопин препятствует фотоцветанию полос поглощения БХл.

Работа выполнена при частичной поддержке грантов РФФИ (15-04-02660а, 17-04-00929а), а также гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (МК-187.2017.4).

**АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО
ОТВЕТА В ЛИСТЯХ ГОРОХА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ
РАЗДРАЖИТЕЛЕЙ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ**
Analysis of features of photosynthetic response in leaves of peas at influence of
stimuli of different nature

М. А. Мудрилов, Е. Н. Громова, В. С. Сухов, В. А. Воденеев

Университет Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23;
E-mail: mtengri@yandex.ru; тел: +7(910)1316433

В высших растениях в ответ на многочисленные внешние стимулы генерируется широкий спектр функциональных ответов, среди которых особую важность представляет изменения в фотосинтезе [1]. Причем известно, что параметры фотосинтетического ответа могут различаться при воздействии раздражителей различной природы и модальности [2]. Возможной причиной такого эффекта может являться различие в параметрах переменного потенциала (ВП), генерируемого в ответ на раздражители, чьи параметры, такие как вероятность возникновения и скорость распространения, проявляют зависимость от типа раздражителя. Поиск подобной зависимости параметров фотосинтетического ответа от типа раздражителя является целью данной работы.

Объектом исследования выступали 2–3-х недельные проростки гороха (*Pisum sativum* L.). В качестве локальных раздражителей использовали ожог открытым пламенем, постепенный нагрев и раздавливание участка листа. Регистрация фотосинтетического ответа производилась при помощи РАМ-флуориметра, на листе, расположенном ниже по стеблю от стимулируемого листа. Электрическую активность фиксировали внеклеточно, электроды размещались на стебле растения и на исследуемом листе. Результаты продемонстрировали, что генерируемый вследствие воздействия переменный потенциал вызывает фотосинтетический ответ, выразившийся в значительном снижении эффективности фотохимических реакций фотосистемы II (YII) и ростом уровня нефотохимического тушения (NPQ). В случае отсутствия ВП, фотосинтетическая реакция также не фиксировалась. Кроме того, было показано различие в амплитудах и скоростях распространения волны фотосинтетического ответа для различных типов раздражителей, проявляя зависимость от параметров ВП.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки, проект № 6.3199.2017/ПЧ.

1. Оприлов В. А., Пятыхин С. С., Ретвинин В. Г. Биоэлектрогенез у высших растений. М. Наука, 1991. 216 с.
2. Lautner S., Grams T. E., Matyssek R., Fromm J. Characteristics of electrical signals in poplar and responses in photosynthesis. *Plant Physiol*, 2005, 138(4), 2200

**ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СИГНАЛЫ КАК МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ
ПРОЦЕССОВ ФОТОСИНТЕЗА И ДЫХАНИЯ**
Electrical signals as mechanism of regulation of photosynthesis and respiration

Владимир Сухов, Владимир Воденеев

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского,
Нижний Новгород, 603950, Россия;
E-mail: vssuh@mail.ru; Tel/Fax: +7(909)292-86-53/+7(831)434-50-56

Произрастая в естественных условиях, растения подвержены действию неблагоприятных факторов окружающей среды. Такое действие зачастую имеет неоднородный характер, т. е. для развития целостного ответа растительного организма требуется генерация и распространение специализированных сигналов. Важную роль среди таких сигналов играют электрические сигналы (ЭС), которые обеспечивают быстрое повышение экспрессии ряда генов, усиление синтеза растительных гормонов, снижение транспирации, активацию дыхания и инактивацию фотосинтеза.

В проблеме регуляторного влияния ЭС на фотосинтез и дыхание можно выделить три основных вопроса: (1) Участвуют ли ЭС в развитии фотосинтетических и дыхательных ответов в интактных частях растений при локальном действии стрессоров? (2) Каким образом развиваются вызванные ЭС ответы? (3) Каково значение таких ответов в жизни растения?

Аргументы, подтверждающие ключевую роль ЭС в индукции фотосинтетических и дыхательных ответов, делятся на две основные группы. Во-первых, амплитуда и временные параметры изменений фотосинтеза и дыхания коррелируют с амплитудой и временными параметрами развития ЭС. Во-вторых, блокирование распространения ЭС приводит к подавлению развития обоих ответов.

Проблема механизмов развития вызванных ЭС фотосинтетических и дыхательных ответов является более дискуссионной. По-видимому, первоначальными индукторами ответов обоих типов является развитие протонного и (или) кальциевого сигналов, которые сопровождают формирование ЭС. Дальнейшее развитие фотосинтетического ответа связано, в первую очередь, со снижением поглощения CO₂ клетками и инактивацией темновой стадии фотосинтеза. С другой стороны, входящие в строму и люмен хлоропластов протоны могут оказывать независимое влияние на активность световой стадии фотосинтеза, снижая нециклический поток электронов и повышая диссипацию световой энергии. Пути развития дыхательных ответов в настоящее время неизвестны и требуют дальнейших исследований.

По-видимому, итоговое значение вызванных ЭС фотосинтетических и дыхательных ответов связано с их участием в повышении устойчивости растения к действию неблагоприятных факторов. В частности, показано, что развитие фотосинтетических ответов участвует в повышении устойчивости фотосинтетического аппарата и растения в целом к высоким температурам. Также показано, что фотосинтетические, и дыхательные ответы увеличивают содержание АТФ в листе, что может иметь существенное значение для процессов репарации после действия неблагоприятных факторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект №16-04-01694.

**ВЛИЯНИЕ ВАРИАБЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА НА ПОГЛОЩЕНИЕ
ЭНЕРГИИ ФОТОСИСТЕМОЙ II И ПОТОК ЭЛЕКТРОНОВ ЧЕРЕЗ
ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ ЛИСТА ГОРОХА**
Influence of variable potential on absorption of energy by photosystem II and
electron flux across photosynthetic apparatus in pea leaf

Е. М. Сухова, В. С. Сухов

Университет Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23;
E-mail: n.catherine@inbox.ru; Fax: +7(831)4345056

Фотосинтез – ключевой процесс в жизни растений. С помощью параметров фотосинтеза возможно оценить состояние растения и его продуктивность. Ранее было показано, что при локальном повреждении растений важную роль в ингибировании фотосинтеза неповрежденных участков играет один из электрических сигналов – переменный потенциал (ВП). Одним из механизмов влияния ВП является инактивация темновой стадии фотосинтеза, в то же время, механизмы его воздействия на работу электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) менее изучены.

В нашей работе исследовалось влияние вызванного ожогом ВП на работу ЭТЦ хлоропластов. Исследования проводились на проростках гороха. С помощью ЛР-теста (M-PEA) и метода ПАМ-флуориметрии (Dual-ПАМ-100) были исследованы потоки электронов и энергии через ЭТЦ.

Нами было показано, что ВП вызывал увеличение поглощения энергии ЭТЦ, сопровождающееся ростом ее диссипации. При этом отношение энергии, уловленной фотосистемой II (PSII) и диссипированной ею, спадало во времени. Доля поглощенной энергии, идущей к PSII, несколько увеличилась по сравнению с начальным уровнем. Полученный результат показывает, что ВП индуцировал перераспределение энергии между фотосистемами II и I. Возможно, это связано с перемещением светособирающей антенны к PSII.

Последующий анализ работы ЭТЦ хлоропластов показал, что при индукции ВП увеличивался поток электронов, переносимых через один реакционный центр и восстанавливающих крайние акцепторы на акцепторной стороне фотосистемы I, который затем возвращался к исходному уровню. Дополнительно было исследовано влияние ВП на замедленную флуоресценцию. Светосумма замедленной флуоресценции микросекундной компоненты достоверно возросла после индукции ВП, и через некоторое время снижалась до исходного уровня. Анализ светосумм компоненты со временами жизни до 10 мс показал тенденцию к возрастанию, а светосуммы компоненты с временами жизни от сотен мс до нескольких секунд демонстрировали недостоверное снижение. Вероятно, быстрое возрастание потока электронов через ЭТЦ может быть связано со снижением рН стромы хлоропластов и усилением переноса H⁺ пластохинонами, а последующее медленное снижение потока связано с увеличением диссипации энергии ЭТЦ, вызванной механизмами нефотохимического тушения и рекомбинацией зарядов в PSII при возрастании потенциала на мембране тилакоидов.

Полученные результаты показывают возможные пути участия ВП в регуляции ответа фотосинтеза в условиях затемнения. Анализ роли этих путей в регуляции фотосинтеза в условиях постоянного освещения требует дальнейших исследований.

**ИЗМЕНЕНИЯ ЛАТЕРАЛЬНОЙ ПОДВИЖНОСТИ КОМПОНЕНТОВ
ТИЛАКОИДНЫХ МЕМБРАН МУТАНТОВ *chlorina* ЯЧМЕНЯ И
АРАБИДОПСИСА, ДЕФЕКТНЫХ ПО БИОСИНТЕЗУ ХЛОРОФИЛЛА *b***
Alterations in lateral mobility of integral components in thylakoid membranes of
barley and Arabidopsis *chlorina* mutants impaired in chlorophyll *b* synthesis

Е. В. Тютерева, А. И. Евкайкина, А. Н. Иванова, О. В. Войцеховская

ФГБУН Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, ул. Профессора Попова, 2,
Санкт-Петербург, 197376, Россия
E-mail: ETutereva@binran.ru; Fax: +7(812)372-54-43

Латеральная подвижность компонентов тилакоидной мембраны зависит от размера интегральных мембранных частиц – фотосинтетических пигмент-белковых комплексов, а также от плотности их упаковки в мембране. В изменяющихся условиях среды эффективная регуляция латеральной подвижности может оказывать значительное влияние на скорость транспорта электронов, репарацию поврежденных фотосистем и весь фотосинтетический процесс в целом. Размер частиц фотосистем зависит от их состава. Известно, что размер светособирающей антенны ФСII регулируется изменениями в биосинтезе хлорофилла *b* (Хлб). Блок биосинтеза Хлб приводит к конститутивной деградации в хлоропластах сразу нескольких ЛНС белков, что вызывает полное отсутствие тримеров ССКII, уменьшение антенн фотосистем и, в связи с этим, значительное снижение размера суперкомплексов, формируемых на основе ФСII. Целью данной работы было исследовать, каким образом блок биосинтеза Хлб влияет на латеральную подвижность белковых комплексов и липидов в мембранах хлоропластов мутанта ячменя *chlorina* f2 3613 (*clo* f23613), и мутанта арабидопсиса *chl-3* по сравнению с растениями дикого типа. Также предполагалось выяснить, есть ли взаимосвязь между изменениями в подвижности компонентов мембраны и показанным ранее снижением интенсивности фотосинтеза мутантов. Методом анализа восстановления флуоресценции после фотовыцветания (FRAP) были определены размеры мобильных фракций хлорофилл-связывающих белков и липидов, а также временные характеристики диффузии этих компонентов в тилакоидных мембранах. Полученные данные были сопоставлены с составом и размером антенн мутантов и растений дикого типа, с размером пластохинонового пула и его редокс-динамикой на свету по данным ПАМ-флуориметрии, а также характеристиками переноса электронов по ЭТЦ путем регистрации кривых ОЛР. Для мутанта ячменя *chlorina* f2 3613 дополнительно изучали: (1) накопление активных форм кислорода (АФК) в листьях на свету с помощью флуоресцентных красителей (SOSG и CM-H₂DCFDA), (2) стехиометрическое соотношение количества реакционных центров ФСII и цитохромных *b6/f*-комплексов методом вестерн-блоттинга, и (3) расположение частиц ФСII на поверхности выделенных гранальных мембран методами ТЭМ. Оказалось, что характер изменений антенны, вызванных блоком биосинтеза Хлб вследствие дефекта в ферменте хлорофилл-а-оксигеназе (CAO), сходен в мутантах ячменя и арабидопсиса. Несмотря на это, подвижность белковых и липидных компонентов тилакоидных мембран у этих мутантов изменена различным образом, что согласуется с наблюдаемыми изменениями в редокс-динамике пластохинонового пула. В целом полученные данные свидетельствуют о сложности плейотропных эффектов, вызванных мутацией в гене *CAO* у разных видов.

Мутанты *chlorina* – модель для экономически значимого повышения продуктивности растений
Chlorina mutants as models to explore economically significant increases in plant productivity

Елена Тютерева¹, Александра Иванова¹, Wolfram Brenner²,
 Валерия Дмитриева¹, Katharina Pawlowski³, Ольга Войцеховская¹

1 – ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН (БИН РАН), г. Санкт-Петербург, Россия; E-mail: ovoitse@binran.ru
 2 – Freie Universitaet Berlin, Berlin, Germany
 3 – Stockholm University, Stockholm, Sweden

Мутанты *chlorina* отличаются высокой эффективностью фотосинтетического аппарата: скорость переноса электрона в пределах ФС2, а также скорость ассимиляции CO₂ на единицу хлорофилла, у них на 15–20% выше, чем у растений дикого типа. Потенциально, использование сельскохозяйственных культур с таким типом организации фотосинтетического аппарата может дать высокий прирост урожая. Однако, до настоящего времени такие мутанты не рассматривались как перспективные модели для создания сортов и трансгенов с экономически значимым увеличением продуктивности. Это связано с тем, что побочные эффекты мутаций *chlorina*, в первую очередь, высокий уровень продукции активных форм кислорода в фотосинтетическом аппарате таких мутантов, сводят на нет потенциальную пользу от повышения эффективности фотосинтетической фиксации. В данной работе проводилось выявление первичных и вторичных эффектов, ингибирующих фотосинтез, рост и развитие лишённого хлорофилла *b* мутанта ячменя *clo-f2³⁶¹³*, а также поиск механизмов, которые позволили бы повысить фотосинтетическую продуктивность и урожайность таких растений при выращивании в открытом грунте. Обнаружено, что ключевым механизмом, вызывающим повышение продукции АФК у мутанта *clo-f2³⁶¹³*, может быть хроническое перевосстановление пула пластохинона, вызванное затруднениями латеральной диффузии в гранальных мембранах. В наших экспериментах снятие перевосстановления пластохинонового пула путем временного затенения растений *clo-f2³⁶¹³* индуцировало биосинтез белков малой антенны, в первую очередь LHCB6, и приводило к восстановлению параметров латеральной диффузии, предположительно за счет увеличения размеров суперкомплексов на основе ФС2. Это сопровождалось нормализацией продукции АФК и возрастанием фотосинтетической фиксации CO₂ до значений выше, чем у дикого типа. Одновременно у растений *clo-f2³⁶¹³* восстанавливалась нормальная устьичная регуляция. Кроме того, снижение уровня продукции АФК восстанавливало онтогенетическую регуляцию *clo-f2³⁶¹³*. По нашим данным, механизмом, мешающим своевременному переходу к цветению у мутантов *chlorina*, является нарушение формирования плазмодесм вследствие хронического окислительного стресса. Анализ экспрессии 22000 генов у мутанта *clo-f2³⁶¹³* и дикого типа выявил две перспективные для дальнейшей работы группы генов.

Исследование поддержано РНФ (грант №14-16-00120-П). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург) и Ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

Влияние дефицита фитохромов на активность фотосистемы 2 при действии УФ-В радиации
 Effect of phytochrome deficiency on activity of photosystem 2 at exposure to UV-B

Александра Худякова^{1,2}, Галина Ширшикова¹, Валерий Любимов¹,
 Владимир Креславский^{1,2}

1 – Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пушкино, Московская область, 142290, Россия
 2 – Институт физиологии растений РАН, Москва, 127276, Россия
 E-mail: s_t_i_m_a@mail.ru; Fax: +7(496)777-90-32

Фотосинтетический аппарат (ФА) растений и, в том числе, фотосистема 2 (ФС2) играют важную роль в развитии механизмов адаптации и устойчивости растений к стрессовым факторам окружающей среды, в частности, УФ-В-излучению. В процессах адаптации и стрессоустойчивости важную роль играют фоторецепторы фитохромы. Удобным объектом для изучения роли фитохромов в функционировании ФА являются мутантные растения арабидопсиса с дефицитом этих фоторецепторов.

В нашей работе были использованы 26-дн. растения *Arabidopsis thaliana* как дикого типа (ДТ), так и мутанты, дефицитные по фитохромам В и А (ФхВ и ФхА) одновременно (ДМ – двойной мутант), и мутант *hy2*, дефицитный по хромофору фитохромов. Растения выращивали на белом (БС) и красном (КС) свету с интенсивностью 130 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹ и 12 ч фотопериоде. При облучении растений использовали УФ-В лампу ($\lambda_m = 311 \pm 3$ нм, $I = 1$ Вт м⁻²), время экспозиции – 1 и 2 ч. Активность ФС2 в растениях ДТ, выращенных на БС, была такой же, как и в растениях ДМ или *hy2*. При этом содержание хлорофиллов и каротиноидов было меньше у ДМ на 15–20% по сравнению с ДТ, а содержание УФ-поглощающих пигментов (УФПП) у мутантов было меньше в 1,5 раза. Облучение УФ-В приводило к снижению активности ФС2, то есть квантовые выходы F_v/F_m и $Y(II)$ снижались, а содержание Q_B -невосстанавливаемых центров (Q_B -НЦ) и скорость диссипации (СД) световой энергии преимущественно в тепло увеличивались. В мутантных растениях *hy2* и ДМ, выращенных на БС, после воздействия УФ-В наблюдаемое увеличение параметров Q_B -НЦ и СД было больше по сравнению с ДТ. При выращивании на КС активность ФС2 в растениях ДМ была меньше, чем у ДТ. Эти растения показали более значительные изменения всех флуоресцентных параметров (F_v/F_m , $Y(II)$, содержание Q_B -НЦ и СД) после УФ-В-облучения и большую разницу между этими параметрами для ДТ и ДМ, чем у растений, выращенных на БС.

Методом RT-PCR (Real Time PCR) был определен уровень экспрессии некоторых генов – протохлорофиллид оксидоредуктазы В (*POR-B*), POR-подобного белка (*POR-C*), стромальной аскорбатпероксидазы (*sAPX*), а также гена *HY2*, кодирующего синтез фитохромобилинсинтазы. Обнаружено, что активность генов *POR-B*, *POR-C* и *sAPX* у растений, выращенных на БС, была ниже в ДМ по сравнению с ДТ, а на КС – *HY2*.

Таким образом, используя дефицитные по фитохромам мутанты *Arabidopsis thaliana*, выращенные на БС и КС и облученные впоследствии УФ-В-радиацией, мы обнаружили у них значительное снижение активности ФС2. Причиной этого могут быть как уменьшение содержания ключевых пигментов у мутантов, так и снижение транскрипционной активности некоторых важных для функционирования ФА генов.

СЕКЦИЯ 3. ФОТОРЕЦЕПЦИЯ

ФОТОРЕЦЕПТОРНЫЙ КОМПЛЕКС И ОКСИЛИПИНЫ В РЕГУЛЯЦИИ ПУТЕЙ РАЗВИТИЯ *Neurospora crassa*

Photoreceptor complex and oxylipins in regulation of *Neurospora crassa* developmental pathways

Татьяна Белозерская¹, Наталья Гроза²

1 – ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биохимии им. А. Н. Баха, Москва 119031, Россия; E-mail: tabinbi@mail.ru; Fax: +7(495)954-27-32;

2 – Московский Технологический Университет, Институт тонких химических технологий, Москва 119571, Россия; E-mail: grozanv@gmail.com; Fax: +7(495)246-05-55

Механизмы адаптации грибных организмов, широко варьируемых в экосистемах, подразумевают участие целого ряда низкомолекулярных биорегуляторных молекул, включающих жирные кислоты и их оксигенированные производные – оксилипины. Эти сигнальные молекулы модулируют многочисленные пути сигнальной трансдукции, которые запускаются факторами внешней среды. Одним из наиболее важных факторов внешней среды для развития грибов является свет. У грибов обнаружены все классы фоторецепторов, однако подробно они изучены только у *Aspergillus nidulans* и *Neurospora crassa*. Целый ряд физиологических ответов *N. crassa*, включая формирование конидий и протоперитециев, находятся под контролем фоторецептора синего света (350–500 нм) – White Collar complex (WCC). Это гетеродимер, образуемый двумя PAS-домен-содержащими полипептидами WC-1 и WC-2, продуктами генов *white collar-1* и *white collar-2*. Мутационное повреждение любого из этих генов блокирует большинство ответов гриба на действие света. Хромофором фоторецептора служит молекула FAD, которая при освещении ковалентно связывается с остатком цистеина LOV-домена (разновидность PAS домена) белка WC-1. У WC-1 и WC-2 присутствуют «цинковые пальцы», мотивы узнавания GATA-последовательностей в составе промоторов регулируемых светом генов, что заставляет рассматривать их как вероятные факторы транскрипции. В работе исследовано действие сигнальных оксилипинов на половое и бесполое размножение дикого типа и мутантов гриба по фоторецепторному комплексу. Показано, что гидроксигенированное производное линолевой кислоты – 18-гидрокси-(9Z,12Z)-октадекадиеновая кислота (18-HODE) наиболее сильно влияла на процессы воспроизведения гриба: увеличивала конидиообразование под влиянием света (максимум – при 5 мкМ), а количество протоперитециев увеличивалось даже в темноте, продолжая возрастать под действием света. При освещении наблюдался синергизм действия 18-HODE и света. С другой стороны, гидроксигенированное производное линоленовой кислоты – 18-гидрокси-(9Z,12Z,15Z)-октадекатриеновая кислота (18-HOTrE) ингибировала светозависимые процессы размножения у *N. crassa*. Действие 18-HODE и 18-HOTrE на мутанты по фоторецепторному комплексу показали, что действие обоих оксилипинов стимулирует конидиогенез как в темноте, так и на свету. Однако эти соединения не оказывали влияния на образование протоперитециев у мутантных штаммов *N. crassa wc-1* и *wc-2*. Эти данные позволяют сделать предположение об участии WC-комплекса в передаче сигнала оксилипинов, обуславливающего регуляцию полового процесса, стадий в ходе развития грибного организма, которые зависят от изменения условий внешней среды, а также от внутриклеточных ауторегуляторных сигналов, действие которых изучено далеко недостаточно. Жирные кислоты и связанные с ними метаболиты как раз и относятся к такому виду регуляторов. Оксилипины представляют значительное и сильно варьируемое семейство вторичных метаболитов, образующихся в результате окисления и дальнейших превращений ПНЖК. Ауторегуляторные сигнальные молекулы регулируют у грибов прорастание спор, морфогенез колоний, бесполое и половое воспроизведение, биосинтез вторичных метаболитов. Они функционируют как гормоноподобные сигналы, модулирующие время наступления и баланс полового и бесполого воспроизведения.

Na⁺-РОДОПСИН, НОВЫЙ КЛАСС СВЕТОЗАВИСИМЫХ ИОННЫХ ПОМП Na⁺-rhodopsins, a new class of light-driven ion pumps

Александр Богачев, Юлия Берцова, Адалят Мамедов, Махир Мамедов

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

МГУ им. М. В. Ломоносова, 119234 Москва, Россия

E-mail: bogachev@belozersky.msu.ru; Fax: +7(495)939-03-38

Известно, что различные родопсины могут функционировать в качестве светозависимых переносчиков ионов H⁺ или Cl⁻, а также служить рецепторами света. Однако недавно было установлено, что один из родопсинов морской флавобактерии *Krokinobacter eikastus* (kr2) способен к светозависимому переносу ионов Na⁺ из цитоплазмы во внешнюю среду [1]. Это открытие, а также определение 3D-структуры kr2, инициировали интенсивное исследование молекулярного механизма работы этой уникальной ионной помпы.

Нами показано, что сходный с kr2 родопсин из морской флавобактерии *Dokdonia sp.* PRO95 (NaR) также является первичной натриевой помпой. Мы провели исследование фотоцикла NaR, а также идентификацию его электрогенных и Na⁺-зависимых стадий [2]. Показано, что фотоцикл NaR состоит из четырех основных стадий: $NaR_{519} + hv \rightarrow K_{585} \rightarrow (L_{450} \leftrightarrow M_{495}) \rightarrow O_{585} \rightarrow NaR_{519}$. Для всех стадий фотоцикла определены их характерные времена и вклад в образование Ду. Образование интермедиата O оказалось единственной стадией фотоцикла NaR, зависящей от концентрации Na⁺ с цитоплазматической стороны мембраны. Также нами показано, что замена остатка NaR Gln123 на аспартат или глутамат приводит к появлению H⁺-транспортирующей активности у этого белка. Мутантная форма Q123E оказалась способной к транспорту протонов даже при 100 мМ концентрации Na⁺. Таким образом, замена всего лишь одного аминокислотного остатка приводит к полному изменению ионной специфичности NaR [3]. На основе полученных данных предложен механизм свето-индуцированного транспорта Na⁺ родопсином.

Исследована возможность присутствия каротиноидной антенны в NaR. Инкубация препарата рекомбинантного NaR с каротиноидами *Dokdonia sp.* PRO95 или с салиниксантином не сопровождалась изменениями в оптических спектрах поглощения и кругового дихроизма, свидетельствующими о связывании этих каротиноидов с NaR. Эти данные, наряду с данными анализа геномов *Dokdonia sp.* PRO95 и других флавобактерий, позволяют заключить, что NaR не содержит каротиноидной антенны [4]. Однако единичная замена T216G в NaR приводит к способности использовать каротиноид кантаксантин в качестве антенного хромофора, что указывает на утерю этой важной особенности кантородопсинов в ходе эволюции NaR.

1. Inoue K., Ono H., Abe-Yoshizumi R., Yoshizawa S., Ito H., Kogure K., Kandori H., *Nat. Commun.*, 2013, 4, 1678
2. Bogachev A. V., Bertsova Y. V., Verkhovskaya M. L., Mamedov M. D., Skulachev V. P., *Sci. Rep.*, 2016, 6, 21397
3. Mamedov M. D., Mamedov A. M., Bertsova Y. V., Bogachev A. V., *FEBS Lett.*, 2016, 590 (17), 2827
4. Bertsova Y. V., Arutyunyan A. M., Bogachev A. V., *Biochemistry (Moscow)*, 2016, 81 (4), 414

«АНТЕННЫЕ» МОЛЕКУЛЫ СЕМЕЙСТВА ФОТОРЕЦЕПТОРНЫХ БЕЛКОВ ДНК-ФОТОЛИАЗ / КРИПТОХРОМОВ
“Antenna” molecules of the photolyase / cryptochrome family blue-light photoreceptors

Ю. Л. Вечтомова, Т. А. Телегина, М. С. Крицкий

Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук. 119071 Москва, Россия
 E-mail: vechtomova@inbi.ras.ru; Fax: +7-495-954-27-32

Для всех организмов важно защитить свой генетический материал от разрушительного воздействия УФ излучения (различные системы репарации ДНК, в том числе ДНК-фотолиазы) и сформировать правильные поведенческие ответы на воздействие света (фотоморфогенез, фототропизм, циркадные ритмы и др.). И в том и в другом случае необходимы фоторецепторы, которые бы могли эффективно поглощать энергию света в нужной области спектра и запускать защитные механизмы. В фоторецепторных белках семейства ДНК-фотолиаз / криптохромов, отвечающих за различные ответы на ближний УФ и синий свет, такими молекулами являются производные флавина. Для дополнительного сбора энергии света существуют так называемые «антенные» молекулы. И хотя эти белки в состоянии выполнять свои функции и без таких «антенных» молекул, их наличие повышает эффективность работы этих фоторецепторных белков в десятки раз, давая преимущество в выживании организмам, у которых они есть. У большинства изученных организмов в этой роли выступают 5,10-метенилтетрагидрофолат и 8-гидрокси-5-дезафлавин.

Каким требованиям должна отвечать антенная молекула? Во-первых, она должна эффективно поглощать энергию в нужной области; во-вторых, молекула должна эффективно передать энергию на молекулу акцептора; в-третьих, молекула должна быть устойчивой к воздействию света и не разрушаться при этом, возвращаясь в исходное состояние после передачи энергии. И последнее требование – это доступность для организма, т.е. либо должен быть путь биосинтеза такой молекулы, либо устойчивая возможность получать её из окружающей среды.

В данной работе мы изучали устойчивость молекулы 5,10-метенилтетрагидрофолата в различных условиях при воздействии УФ облучения в максимуме поглощения (350 нм). И показали, что эта молекула отвечает всем вышеперечисленным требованиям для антенной молекулы. Полученные результаты были рассмотрены в контексте эволюции фоторецепторных белков семейства ДНК-фотолиаз / криптохромов.

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА, ОБРАЗОВАНИЕ ПЛАЗМОДЕСМ И ФИТОХРОМНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ У МУТАНТОВ *chlorina Arabidopsis thaliana* И *Hordeum vulgare*
Reactive oxygen species, plasmodesmata formation and phytochrome signaling in *chlorina* mutants of *Arabidopsis* and barley

Валерия Дмитриева¹, Елена Тютерева¹, Александра Иванова², Анастасия Евкайкина², Екатерина Климова¹, Ольга Войцеховская¹

1 – ФГБУН Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН (БИН РАН), лаборатория экологической физиологии, г. Санкт-Петербург, Россия; E-mail: valeriyadml@gmail.com
 2 – ФГБУН Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН (БИН РАН), лаборатория анатомии и морфологии растений, г. Санкт-Петербург, Россия

Мутанты *chl1 Arabidopsis thaliana* и *clo-f2 Hordeum vulgare* (ячменя) неспособны к биосинтезу хлорофилла *b* вследствие мутации в гене, кодирующем хлорофиллид-а-оксигеназу САО. Хотя такие мутанты и жизнеспособны, они характеризуются многочисленными нарушениями как на клеточном, так и на организменном уровне. Поскольку хлорофилл *b* необходим для сборки антенны, у мутантов *chl1 Arabidopsis thaliana* и *clo-f2 Hordeum vulgare* не может сформироваться нормальная антенна, пигмент-белковые комплексы их фотосинтетического аппарата оказываются дестабилизированными [1, 2]. Так как при интенсивном освещении антенна участвует в рассеивании избыточной энергии, мутанты с дефектной антенной подвержены сильному окислительному стрессу, при котором интенсивно продуцируются активные формы кислорода (АФК), в первую очередь синглетный кислород.

АФК могут не только оказывать разрушительное воздействие на биомолекулы, но и выступать в качестве источника сигналов от органелл, в том числе хлоропластов. Недавние исследования показали, что редокс-сигналы из хлоропластов регулируют количество и функциональную способность плазмодесм [3, 4]. Плазмодесмы, в свою очередь, обеспечивают взаимодействие между клетками растений. По симпласту транспортируются белки-транскрипционные факторы [5, 6], в том числе «флориген» FLOWERING LOCUS T (FT), основной фактор запуска цветения. Также по плазмодесмам диффундируют не идентифицированные пока сигналы от фитохрома B (PhyB) [7], которые оказывают опосредованное ингибиторное воздействие на FT и замедляют переход к цветению. Таким образом, изменение количества и пропускной способности плазмодесм оказывает влияние на регуляцию онтогенеза.

В данной работе изучено влияние дестабилизации пигмент-белковых комплексов антенны у неспособных к синтезу хлорофилла *b* мутантов *chl1 Arabidopsis thaliana* и *clo-f2 Hordeum vulgare* на уровне продукции АФК, количество и пропускную способность плазмодесм и переход растений к цветению. Полученные данные позволяют выявить взаимосвязь между нарушениями биосинтеза хлорофилла *b* и регуляцией цветения, и предложить механизм такой взаимосвязи.

Исследование поддержано РНФ (грант №14-16-00120-П). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург) и Ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

1. Bossmann B. L., Grimme H., Knoetzel J., *Planta*, 1999, 207 (1), 551
2. Takabayashi A., Kurihara K., Kuwano M., Kasahara Y., Tanaka R., Tanaka A., *Plant Cell Physiol*, 2011, 52 (12), 2103
3. Burch-Smith T. M., Zambryski P. C., *Annual Review of Plant Biology*, 2012, 63, 239
4. Stonebloom S., Brunkard J. O., Cheung A. C., Jiang K., Feldman L., Zambryski P., *Plant Physiology*, 2012, 158, 190
5. Urbanus S. L., Dinh Q. D. P., Angenent G. C., Immink R. G. H., *Plant Signaling & Behavior*, 2010, 5 (10), 1260
6. Becker A., Ehlers K., *Protoplasma*, 2015, DOI 10.1007/s00709-015-0812-7
7. Imaizumi T., Kay A., *TRENDS in Plant Science*, 2006, 11 (11), 550

**НИЗКОИНТЕНСИВНОЕ ЛАЗЕРНОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ – ИНДУКТОР
СТРЕССОВОГО ОТВЕТА В РАСТИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ**
Low-intensity laser irradiation – inductor of stress response in plant tissue

Л. В. Дударева

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск,
Лермонтова 132; E-mail: laser@sifibr.irk.ru, Тел: +7(395)242-58-92

К настоящему времени тот факт, что низкоинтенсивное излучение лазера (НИЛ) инфракрасного и видимого диапазонов при определенных условиях оказывает стимулирующее влияние на растительные ткани, можно считать доказанным [1, 2]. Однако пути этого влияния, вклад в их осуществление физических характеристик излучения, а также ключевые соединения, участвующие в реализации действия света лазера, по-прежнему, остаются предметом дискуссии. Известно, что физиологический статус растения во многом зависит от интенсивности света, его спектрального состава, дозы излучения и периодичности освещения. Поскольку НИЛ с длиной волны 632,8 нм может оказывать действие на такие физиологические процессы у растений, между которыми отсутствует выраженная взаимосвязь, то при реализации его влияния, по-видимому, задействован неспецифический, общий для многих событий в жизни растения механизм. Логично предположить, что именно стресс, как неспецифический системный ответ, может являться одним из путей действия НИЛ на растительные ткани. Цель представляемого исследования заключалась в обосновании положения о стрессовом характере действия НИЛ в стимулирующей дозе на растительные ткани с помощью анализа происходящих в них биохимических и физиологических изменений, характерных для стресса. Полученные данные подтверждают, что действие лазерного излучения низкой интенсивности на растительные объекты на начальном этапе отклика на облучение может вызывать реакцию подобную стрессовой. Например, выявлено значительное увеличение количества «стрессовых» аминокислот – пролина, гидроксипролина и некоторых других, повышение содержания первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов, изменение активности ферментов. Кроме того установлено, что НИЛ в используемых для стимуляции дозах оказывает заметное влияние на состав и структуру липидов в каллусной ткани пшеницы, под его влиянием происходят существенные изменения в составе жирных кислот и в степени их ненасыщенности. В отношении фитогормонов показано, что первичный ответ на облучение состоял в снижении содержания жасмоновой и индолилуксусной кислот и, одновременно, в значительном увеличении содержания «стрессовых» абсцизовой и салициловой кислот. Выявлена специфическая составляющая реакции на НИЛ, выражающаяся в изменениях фотосинтетической активности, в составе и количестве фотопротекторных соединений. Возможно, именно стрессовым характером реакции на облучение объясняется как универсальность действия этого вида излучения на растительные и животные ткани, так и зависимость результата этого воздействия от состояния облучаемой ткани.

1. V. D. Kreslavski, I. R. Fomina, D. A. Los, R. Carpentier, V. V. Kuznetsov, S. I. Allakhverdiev. // *J. Photochem. Photobiol.* 2012. Т. 13. С. 190
2. Hernandez A. C., Dominguez P. A., Cruz O. A., Ivanov R., Carballo C. A., and Zepeda B. R. *Int. Agrophys.* 2010. V. 24. P. 407

**ФУНКЦИОНАЛЬНО РАЗНЫЕ НАТИВНЫЕ ПУЛЫ ФИТОХРОМА А
ОТЛИЧАЮТСЯ ДРУГ ОТ ДРУГА ФОСФОРИЛИРОВАНИЕМ
ПО СЕРИНУ В N-КОНЦЕВОМ СЕГМЕНТЕ МОЛЕКУЛЫ**
Functionally different native phytochrome A pools differ from one another
by the serine phosphorylation at the N-terminal molecular segment

Лариса Коппель¹, Cordelia Bolle², Виталий Синещёков¹

1 – Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия;
E-mail: koppelar@gmail.com;
2 – Biology Department, Ludwig Maximilian University, München, D–8152, Germany

Фитохромная система регулирует рост, развитие и адаптацию растений к световым условиям окружающей среды. Главным её компонентом является фитохром А (phyA), осуществляющий весь набор типов регуляторных фотоответов, включая сверхнизко-, низко- и высокоэнергетические реакции (VLFR, LFR и NIR, соответственно). По нашим представлениям, такое многообразие функций phyA связано с обнаруженными нами двумя фотохимически и функционально разными пулами phyA – phyA' и phyA'' – продуктами одного гена PHYA, пост-трансляционно модифицированными по N-концевому участку [1]. Мы изучали роль фосфорилирования phyA в формировании нативных пулов методом низкотемпературной (85 K) флуоресцентной спектроскопии пигмента *in situ*. Объектами исследования были бесфитохромные мутанты *phyA* и *phyAphyB* трансгенного *Arabidopsis thaliana*, сверхэкспрессирующего phyA риса дикого типа (phyA WT) или мутантного (phyA SA) с заменой первых 10 серинов на аланин в N-концевом сегменте молекулы. Такая замена предотвращала фосфорилирование phyA по этим сайтам и модифицировала фотоответы [2].

Наше исследование [3] показало, что общее содержание пигмента было сравнимо в трансгенных растениях *Arabidopsis* с экспрессией phyA дикого типа и мутантного. Однако, в растениях, экспрессирующих phyA WT, преобладал пул phyA', тогда как замена серинов на аланины в N-конце молекулы приводила к исчезновению или существенному падению содержания пула phyA' и полному доминированию phyA''. Этот факт свидетельствует о том, что пулы phyA' и phyA'' различаются фосфорилированием по сериновому аминокислотному остатку (остаткам) в N-концевом сегменте молекулы: phyA' является фосфорилированной формой, phyA'' – дефосфорилированной. С другой стороны, прослеженные физиологические ответы исследуемых трансгенных растений *Arabidopsis* и анализ ранее полученных результатов [2] позволяют сделать вывод о том, что phyA'' опосредует фоторегуляторные реакции высокоэнергетического типа (NIR), включая индукцию прорастания семян и ряд ростовых реакций в ходе деэтиляции. Проведенное исследование доказывает положение [1] о том, что пост-трансляционная модификация phyA и дифференциация на подпулы включают фосфорилирование пигмента и обуславливают существование различных типов его фотоответов.

1. Синещёков В. А., Фитохром А: полиморфизм и полифункциональность. Москва, Научный мир, 2013, 162 с.
2. Kneissl J., Shinomura T., Furuya M., Bolle C. *Molecular plant*, 2008, 1(1), 84
3. Sineshchekov V., Koppel L., Bolle C. *Functional Plant Biology*, 2016

**СВЕТОЗАВИСИМЫЙ ТРАНСПОРТ ПРОТОНОВ РЕТИНАЛЬНЫМ
БЕЛКОМ *Exiguobacterium sibiricum***
Light-dependent proton transport by retinal protein from *Exiguobacterium
sibiricum*

**Лада Петровская¹, Евгений Лукашев², Махир Мамедов³, Сергей Силецкий³,
Сергей Балашов⁴**

1 – Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова
РАН, 117997, Москва, Россия; E-mail: lpetr65@yahoo.com

2 – Московский Государственный Университет им. М. В. Ломоносова,
Биологический факультет, 119234, Москва, Россия

3 – НИИ ФХБ им. А. Н. Белозерского, Московский Государственный Университет
им. М. В. Ломоносова, 119992, Москва, Россия

4 – University of California, Irvine, CA92697, USA

Микробные родопсины – интегральные мембранные белки, осуществляющие светозависимый транспорт ионов, сенсорные и другие функции. Нами получен ретинальный белок психротрофной бактерии *Exiguobacterium sibiricum* (ESR) и исследованы его свойства. Уникальной чертой ESR является наличие остатка лизина в положении 96, соответствующем донору протонов (функцию которого в большинстве микробных родопсинов выполняют Asp или Glu). Исследование мутантов, содержащих замены этого остатка, продемонстрировало, что лизин обеспечивает быструю доставку протонов к основанию Шиффа. Поглощение протонов на цитоплазматической поверхности белка предшествует репротонированию основания Шиффа, позволяя предположить, что Lys96, незаряженный в исходном состоянии, приобретает протон в течение короткого промежутка времени после образования интермедиата M [1]. Выделение H⁺ происходит в конце цикла с участием акцептора протонов Asp85 и вероятно взаимодействующего с ним остатка His57 [2].

Исследование перемещения зарядов с использованием прямого электрометрического метода [3] показало, что образующаяся в процессе функционирования ESR разность потенциалов по амплитуде сопоставима с данными, полученными при аналогичных исследованиях бактериородопсина, однако кинетические компоненты ответа существенно отличаются по pH-зависимости и амплитуде, что связано с различными механизмами поглощения и выделения H⁺. Наиболее выраженной pH-зависимостью обладают фазы электрогенеза, связанные с переносом протона из среды на основание Шиффа. При помощи кинетического анализа впервые удалось обнаружить оптически нейтральную стадию электрогенеза при pH 8.4, предположительно соответствующую переносу протона из среды на донорный остаток Lys96.

Работа проводится при финансовой поддержке грантов НШ-8384.2016.4 и РФФИ 15-04-06266а.

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

**ФОТОРЕЦЕПТОРЫ МОГУТ ОПРЕДЕЛЯТЬ СТРЕСС-
УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ**
Photoreceptors could be involved in plant stress tolerance

Ирина Стриж

Кафедра физиологии растений биологического факультета Московского
государственного университета им. М. В. Ломоносова, 119234, Ленинские горы д.1,
кор. 12, г. Москва, Россия
E-mail: irina.strizh@mail.ru; Факс.: +7(495)939-43-09

Важнейшая роль фоторецепторов в регуляции роста и развития растений является установленным фактом. Хорошо известно, что крайне низкие интенсивности и определенные длины волн видимого света могут запускать различные программы развития растений: фотоморфогенез, фототропизм и фотопериодизм. Открытым вопросом является участие фототропинов, криптохромов и фитохромов в стресс-устойчивости растений. Необходимо отметить, что основные молекулярные механизмы участия фоторецепторов в росте и развитии растений получены благодаря модельному растению *Arabidopsis*. Выращивание арабидопсиса в чашках Петри при полном освещении и корней, и побегов является традиционной методикой, используемой биологами растений. Вместе с тем, согласно общепринятому мнению, свет является негативным и даже стрессовым фактором для роста корня растений. Однако сопоставление длины и скорости роста корня *Arabidopsis* в темноте и на свету позволяет говорить, что свет способствует росту корней. Можно предположить, что свет является не столько стрессовым, сколько сигнальным фактором для агелиотропного роста корней. Насколько значима фоторецепция в условиях солевого стресса является одной из актуальных фундаментальных и прикладных проблем. Целью настоящей работы было установить взаимосвязь между фоторецепцией света проростками *Arabidopsis* и их устойчивостью к солевому стрессу. В качестве объекта настоящего исследования использовали растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., экотипа Columbia дикого типа и мутанты по основным фоторецепторам растений: *phya*, *phyb*, *phot1*, *phot2*, *cry1*, *cry2* выращиваемые в чашках Петри на среде MS/2, 0,8% агар, pH 5.7, при 16-часовом фотопериоде (70 мкЕ/м²с). Был измерен первичный рост корней, а также сопоставлены фенотипы, скорость прорастания и время выживания растений, постоянно растущих на средах, содержащих 0, 50, 100 или 150 мМ NaCl. Мутанты по фоторецепторам синего света в условиях засоления стандартно отличались от растений дикого типа хорошей всхожестью, скоростью роста первичного корня и длительностью выживания. Наиболее яркой наглядно видимой солеустойчивостью отличался мутант *phot2*. Различный эффект при выращивании в условиях засоления белков PHOT1 и PHOT2, различающихся по чувствительности к интенсивности светового потока, позволяет предполагать различия в механизмах трансдукции сигнала. Мутанты по фитохромам хуже выживали по сравнению с диким типом при высокосолевым стрессе. Обнаруженный эффект позволяет говорить, что фитохромы способствуют солеустойчивости растений. Анализируя статистически полученные результаты, можно говорить, что фоторецепторы участвуют в стресс-устойчивости, в частности в солеустойчивости, *Arabidopsis* и основным фактором является спектральный состав и интенсивность света, рецептируемого как побегом, так и корнем.

РОЛЬ ФОТОХИМИЧЕСКИХ ПРЕВРАЩЕНИЙ ТЕТРАГИДРОБИОПТЕРИНА В ПАТОГЕНЕЗЕ И ЛЕЧЕНИИ ВИТИЛИГО

The role of photochemical transformations of tetrahydrobiopterin in pathogenesis and treatment of vitiligo

**Т. А. Телегина¹, А. А. Буглак², Т. А. Людникова¹, Ю. Л. Вечтомова¹,
М. С. Крицкий¹**

1 – Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук. 119071 Москва, Россия;

2 – Санкт-Петербургский государственный университет. 199034 Санкт-Петербург, Россия

E-mail: telegina@inbi.ras.ru; Fax: +7-495-954-27-32;

Витилиго – это дерматологическое заболевание, связанное с нарушением меланогенеза в клетках эпидермиса и проявляющееся в виде депигментированных участков кожи. Тетрагидробиптерин (H_4 Бип) необходим для работы фенилаланин-гидроксилазы – фермента, катализирующего превращение фенилаланина в тирозин, предшественник меланина; вследствие этого H_4 Бип является ключевым коферментом начальных стадий меланогенеза. В свою очередь, тирозин гидроксилируется до диоксифенилаланина с помощью тирозиназы, коферментом которой является ион меди.

При витилиго наблюдается 3–5-кратный *de novo* синтез H_4 Бип ферментом ГТФ-циклогидролазой. H_4 Бип, будучи сильным восстановителем, может ингибировать тирозиназу и блокировать биосинтез меланина. Витилиго также характеризуется накоплением окисленных птеринов в депигментированных клетках кожи. Мы полагаем, что определённый вклад в патогенез витилиго может вносить воздействие на эпидермальные клетки УФА излучения: вероятно, окисленные птерины, в частности биоптерин (Бип), способны сенсibilизировать окисление H_4 Бип, H_2 Бип, НАДН и других восстановленных соединений с образованием пероксида водорода.

Нами показано, что при действии УФВ излучения в области 310 нм на водные растворы H_4 Бип образуются димеры дигидроптерина с максимумом поглощения при 245 нм. Мы полагаем, что реакция димерообразования может протекать *in vivo* при УФВ фототерапии витилиго узкополосным УФ с длиной волны 311 нм или 308 нм. Воздействие УФВ ультрафиолета способно переводить избыточный H_4 Бип в димеры, что может способствовать восстановлению биосинтеза меланина в меланоцитах.

СРАВНЕНИЕ ВРЕМЕНИ ЖИЗНИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ФЛУОРОФОРОВ ЛИПОФУСЦИНОВЫХ ГРАНУЛ КЛЕТОК РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ КАДАВЕРНЫХ ГЛАЗ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И В СЛУЧАЕ ВИЗУАЛИЗИРУЕМОЙ ПАТОЛОГИИ

The comparison of fluorescence lifetime of lipofuscin granule fluorophores contained in the retinal pigment epithelium cells from human cadaver eyes in normal state and in the case of visualized pathology

**М. А. Яковлева¹, М. А. Островский^{1,2}, Т. Б. Фельдман^{1,2}, С. А. Борзенко³,
П. М. Арбуханова³, В. А. Кузьмин¹**

1 – Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва, 119334, Россия; E-mail: lina.invers@gmail.com; Fax: +7(499)137-4101

2 – Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия

3 – Межотраслевой научно-технический комплекс “Микрохирургия глаза” им. С. Н. Фёдорова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 127486, Россия

Для обнаружения патологических изменений комплекса сетчатка/ретикулярный пигментный эпителий (РПЭ) применяют современный неинвазивный метод регистрации аутофлуоресценции (АФ) глазного дна. В его основе лежит получение изображения, создаваемого, главным образом, собственной флуоресценцией липофусциновых гранул (ЛГ), которые образуются и накапливаются в клетках РПЭ в процессе старения и, особенно интенсивно – при развитии дегенеративных заболеваний сетчатки и РПЭ. Флуоресцентные свойства ЛГ обусловлены, в основном, наличием в них бисретиноидов ($A2E$ и др.) и продуктов их фотоокисления и фотодеградации ($A2E_{ox}$). В настоящее время становится актуальным поиск способа выявления ранних доклинических стадий развития патологии, основанного на использовании спектрального количественного параметра, характеризующего специфические изменения АФ глазного дна. В этой связи детектирование времени жизни флуоресценции (ВЖФ) флуорофоров ЛГ при определенных длинах волн становится одним из инструментов, который позволит расширить диагностические возможности метода АФ глазного дна. В настоящей работе проведен сравнительный анализ ВЖФ флуорофоров ЛГ из клеток РПЭ кадаверных глаз человека в норме и в случае визуализируемой патологии. Кадаверные глаза человека были получены из Глазного тканевого банка ФГБУ МНТК “Микрохирургия глаза” им. академика С. Н. Федорова Минздрава России. Измерения ВЖФ проводили при помощи метода подсчета коррелированных во времени фотонов. Сравнительный анализ показал, что при патологии в ЛГ клеток РПЭ происходит увеличение содержания $A2E_{ox}$, что проявляется как в изменении характеристик спектров флуоресценции, так и в параметрах кинетических кривых затухания флуоресценции. Результаты сравнительного анализа ВЖФ бисретиноидов и $A2E_{ox}$ позволяют заключить, что метод подсчета коррелированных во времени фотонов может стать основой для расширения диагностических возможностей метода АФ глазного дна при ранней диагностике возрастной макулярной дегенерации сетчатки.

СЕКЦИЯ 4. ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ ФОТОМЕДИЦИНЫ

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ РАКА. ЧЕТВЕРТЬ ВЕКА В РОССИИ

Е. Ф. Странадко¹, Т. И. Малова²

1 – ФГБУ «ГНЦ лазерной медицины ФМБА России»
2 – ООО «ВЕТА-ГРАНД».

Развитие лазерных технологий в медицине привело к появлению нового метода лечения рака – фотодинамической терапии (ФДТ). В СССР, а с 1992 года в России головным научным учреждением по лазерной тематике является Государственный научный центр лазерной медицины. Естественно, что новая медицинская технология лечения рака разработана в нашем институте под руководством первого директора, члена-корреспондента РАМН, проф. О. К. Скобелкина. В 80-е годы в ряде институтов проводились экспериментальные исследования по фотодинамическому действию лазерного излучения. В отношении злокачественных опухолей его усиливали применением фотосенсибилизаторов. Для этого проводилась работа по ряду направлений:

- скрининг различных химических соединений с целью поиска препаратов, обладающих фотосенсибилизирующими свойствами (Московский институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова);
- выделение и химическая модификация гематопорфиринов (МИТХТ им. М. В. Ломоносова, Институт биофизики МЗ РФ, Ивановский химико-технологический институт), хлоринов (ВНИИ «Биотехника» Минмедпрома, Минский институт фотобиологии), фталоцианинов (Московское научно-производственное объединение «НИОПИК»);
- разработка систем доставки лазерного излучения и дозиметрии (ВНИИ оптических и физических измерений, МВТУ им. Баумана, кафедры общей физики и волновых процессов МГУ им. М. В. Ломоносова, ГНЦ лазерной медицины МЗ РФ);
- изучение молекулярных и мембранных механизмов фотодинамического эффекта в модельных системах (кафедра физико-химической биологии МГУ, ГНЦ лазерной медицины МЗ РФ, Минский институт фотобиологии, Минский университет и медицинский институт, кафедра общей физики МГУ);
- изучение общетоксического и специфического видов действия производных гематопорфирина (ГНЦ лазерной медицины МЗ РФ, Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П. А. Герцена);
- исследование фармакокинетики фотосенсибилизаторов и деструкции перевиваемых опухолей (ГНЦ лазерной медицины МЗ РФ, МНИОИ им. П. А. Герцена, онкологический научный центр АМН РФ, Минский и Вильнюсский институты онкологии).

Особый интерес к порфиринам был обусловлен уникальным сочетанием спектрально-энергетических и химических характеристик, которые обеспечивают не только интенсивное поглощение светового излучения в видимом диапазоне света, но и преобразование его с высокой интенсивностью в энергию высоко-реактивных интермедиатов, способных вызвать глубокие повреждения различных компонентов биологических структур, прежде всего злокачественных опухолей. Однако ни в одном из заинтересованных научно-исследовательских учреждений страны

еще не проводились клинические испытания ФДТ ни с зарубежными, ни с отечественными фотосенсибилизаторами.

В ГНЦ лазерной медицины была подготовлена материально-техническая база для проведения клинической ФДТ: оборудовано помещение и приобретен лазер на красителе с аргоновой накачкой «Иннова-200» американской фирмы «Coherent» (длина волны светового излучения 630 нм, выходная мощность излучения в непрерывном режиме 5 Вт). Параллельно с этим в ГНЦ лазерной медицины совместно с техническими соисполнителями ГНЦ по программе разработки и внедрения метода ФДТ в России разрабатывались отечественные лазеры и нелазерные источники света для ФДТ с фотогемом – первым фотосенсибилизатором из группы производных гематопорфирина отечественного производства.

На основании доклинического изучения специфического фотосенсибилизирующего (световая токсичность) и общетоксического (темновая токсичность) действия фотогема в ГНЦ лазерной медицины были проведены предклинические испытания ФДТ перевиваемых опухолей на экспериментальных животных, подготовлен пакет документов, получено разрешение Фармакологического комитета СССР на клинические испытания, и уже в феврале 1992 года в ГНЦ лазерной медицины мы приступили к клиническим испытаниям метода ФДТ с фотогемом.

За первый год методом ФДТ было пролечено 33 больных с различными злокачественными опухолями. Несмотря на тяжелый контингент подвергнутых ФДТ больных, у 30 из них (91%) был получен положительный эффект, в том числе у 16 (48,5%) – полная резорбция опухолей. Результаты первого года клинических испытаний ФДТ с фотогемом были доложены на I Европейском конгрессе по ФДТ рака 1–3 сентября 1993 года в Будапеште (Венгрия). Получив в результате первых курсов ФДТ полную или выраженную (более 50%) резорбцию поверхностных опухолей при отсутствии осложнений, мы с апреля 1992 года начали применять внутритканевую ФДТ при раке молочной железы, а 1 сентября 1992 года впервые в России применили эндоскопическую ФДТ при центральном раке нижней доли левого легкого с ателектазом. В октябре 1992 года к программе клинической ФДТ рака присоединился МНИОИ им. П. А. Герцена (директор – академик РАМН, проф. В. И. Чиссов, руководитель отделения эндоскопии – проф. В. В. Соколов). В последующие годы клинические испытания метода ФДТ в России приобрели широкомасштабный характер.

В 1996–1998 годах в Институте биомедицинской химии РАМН им. В. Н. Ореховича профессором Г. В. Пономаревым и его учениками создан ряд фотосенсибилизаторов второго поколения, производных хлорина е₆ (фотодитазин, радахлорин и др.) с длиной волны возбуждающего света 662 нм, и уже в 1998 году в ГНЦ лазерной медицины начаты клинические испытания Фотодитазина. Они были проведены на 78 опухолях как наружных, так и внутренних локализаций у 72 больных. Получены хорошие результаты ФДТ: полной резорбции подверглись 70% опухолей. В настоящее время фотосенсибилизаторы хлориновой группы являются наиболее востребованными как в России, так и за рубежом.

В настоящее время ФДТ злокачественных опухолей с Фотодитазиним применяется на всей территории России от западных границ до Владивостока и Камчатки. ООО «ВЕТА-ГРАНД» обеспечивает потребности отечественной медицины как в онкологии, так и при ФДТ целого ряда неопухольевых заболеваний. Методом ФДТ пролечены десятки тысяч больных злокачественными опухолями различных локализаций и стадий процесса. ФДТ находит также широкое применение в стоматологии, дерматологии, косметологии, гнойной хирургии и других отраслях медицины.

**ЭФФЕКТЫ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОГО ОБЛУЧЕНИЯ
МЫШЕЧНЫХ ТКАНЕЙ ЛАЗЕРНЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ ВЫСОКОЙ
ИНТЕНСИВНОСТИ И ШИРОКОПОЛОСНЫМ СВЕТОМ**
Effects of consequent irradiation of the muscle tissues by high-intensity laser light
and broad-band light

Анна Баврина, Виктор Монич, Светлана Малиновская

Нижегородская государственная медицинская академия Минздрава России,
Нижний Новгород, пл. Минина, 10/1, 603005, Россия
E-mail: vamm@list.ru, Fax: +7(831)43-909-43

Both high-intensity red and near infra-red light (NIR) are widely used in photodynamic procedures. Exposition of living tissues to the non-ionizing radiations can lead to side effects both in the target zone and next to it. The effects of overdosage lead to a local increase of temperature, modification of biochemical reactions and enzymes activities [1]. The effects are accompanied by production of reactive oxygen species (ROS) and products of lipid peroxidation. They are similar to those provoked in the living tissues by ionizing radiation and even to the oxidative stress processes which take place in the heart muscle after ischemia of myocardium [2]. The ROS and the lipid peroxidation products can initiate protein oxidative modifications (POM) in the treated specimens.

It seems to be important to find a simple method that could provide full or partial rehabilitation of the living tissues injuries and a laser light impact rate marker. The well-known research results show that low-intensity light (both laser and photo-luminescent and light emitting diode (LED) radiation) is able to decrease the oxidative stress consequences [3–6] and could be used as a physiotherapeutic agent.

50 Wistar rats were divided into 5 groups. The first group received the local dose of red light radiation (671 nm, 50 mW, 0.55 Wcm⁻²) on the thigh muscle. The second group received the same dose of red laser light plus red wideband low-intensity light irradiation (the spectral peak at 640 nm, the band length, 20 nm, 5 mWcm⁻²), one dose per day, exposition time, 20 minutes. The third and the fourth groups received the dose of near-infrared (NIR) high-intensity laser light (980 nm, 0.55 Wcm⁻²) instead of the exposition to the red laser light. The fifth group was intact. Sampling of the tissues was done in the first four groups at the third day after the event of the procedure of high intensity irradiation. Contents of the protein oxidative modifications were measured by using the adapted method of Stadtman [5].

This research results prove efficiency of the method of analysis of POM for evaluating the consequences of a muscular tissue exposure both to high-intensity red and to NIR laser light. The experimental data indicate also that the technology of complex phototherapy involving consecutive exposures of the target living tissues, to laser and to broad-band red light could help to provide radiation safety of procedures based on application of high-intensity laser radiation.

1. Heidari M., Sattarahmady N., Azarpira N. et al, *Lasers Med Sci*, 2016, 31(2), 221–227
2. Monich V. A., Drugova O. V., Lazukin V. F. et al, *J Photochem Photobiol B: Biology*, 105, 21–24
3. Vladimirov Y. A., Osipov A. N., Klebanov G. I., *Biochemistry (Mosc)*. 2004, Jan;69(1), 81–90
4. Bavrina, A. P., Monich V. A., Malinovskaya S. L. et al. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2014, 156(5), 663–664
5. Stadtman E. R., Levine R. L. (2000) *Protein oxidation Ann. NY Acad. Sci.* 899:191–208.

**ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО СВЕТА НА АКТИВНОСТЬ
ГЛУТАТИОНТРАНСФЕРАЗЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**
Glutathione-s-transferase activity influence of low-intensity light in experiment

Анна Баврина, Виктор Монич, Светлана Малиновская

ФГБОУ ВО НижГМА Минздрава России, г. Нижний Новгород, пл. Минина и
Пожарского, д.10/1, 603005, Россия.
E-mail: annabavr@rambler.ru, тел/факс +7(831)439-09-43

Известно, что одним из ключевых механизмов фотобиологического действия низкоинтенсивного света является фотомодификация активности ферментов, в том числе, антиоксидантных [1], что приводит к снижению содержания продуктов свободнорадикального окисления в исследуемых тканях [2]. Вместе с тем, исследована роль не всех звеньев ферментативной регуляции окислительных процессов в развитии каскада фотохимических процессов. В данной работе исследовалось влияние низкоинтенсивного широкополосного света красного диапазона на активность фермента глутатион-s-трансферазы (GST) после альтерации крыс различными физическими факторами (гамма-излучением, лазерным излучением красного и инфракрасного диапазона высокой мощности) и наложением асфиксии. При этом в каждом эксперименте был использован один из стресс-факторов (гамма-излучение, высокоинтенсивное лазерное излучение, наложение асфиксии) с последующим воздействием низкоинтенсивным широкополосным красным светом и выделены 3 группы животных, содержавшихся в одинаковых условиях: контрольная, опытная и интактная группы. Анализ полученных результатов показал статистически значимое снижение активности фермента GST в сыворотке крови контрольных групп животных при воздействии всех использованных стресс-факторов. Также было выявлено отсутствие статистически значимых отличий между интактной и опытной группами, что свидетельствует о возможности коррекции активности GST с помощью экспонирования области поражения низкоинтенсивным красным светом. Данные имели достоверный характер (*p≤0.05) и изменялись в интактной, контрольной и опытной группах следующим образом: при воздействии гамма-излучением на проекционную область сердца 24,5±3,6, 10,6±5,9* и 20,6±5,5, соответственно; при воздействии высокоинтенсивным лазерным излучением инфракрасного спектра 24,4±3,6, 17,8±1,2* и 21,6±4,7, соответственно; при воздействии высокоинтенсивным лазерным излучением красного спектра 24,4±3,6, 15,5±2,9* и 24,1±5,0, соответственно; после наложения асфиксии 25,2±1,48, 12,4±0,5* и 23,6±1,33 (моль/л·мин), соответственно. Таким образом, воздействие низкоинтенсивным широкополосным красным светом на проекционную область сердца и скелетную мышцу крысы после локального воздействия на эти области ионизирующей радиацией или лазерным светом высокой интенсивности, либо после наложения на крысу асфиксии, приводит к увеличению ферментативной активности GST в сыворотке крови крыс. Кроме того, фермент GST является одним из ключевых компонентов отклика биологических тканей на низкоинтенсивное световое воздействие.

Karu T., *J. Photochem. Photobiol. B.*, 1999, 49, 1
Баврина А., Малиновская С., Ермолаев В., Монич В., *Современные технологии в медицине*, 2014, 2, 32.

**ПРИМЕНЕНИЕ ЦИФРОВОЙ ГОЛОГРАФИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ
ДЛЯ МОНИТОРИНГА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ КЛЕТОК,
ВЫЗВАННЫХ ФОТОДИНАМИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ**
**Monitoring of PDT-induced morphological changes of the cells by means of
digital holographic microscopy**

**А. В. Белашов¹, Т. Н. Беляева², О. С. Васютинский¹, А. А. Жихорева^{1,3},
Е. С. Корнилова², Н. В. Петров³, А. В. Салова², И. В. Семенова¹**

1 – Физико-Технический Институт им. А. Ф. Иоффе, Санкт-Петербург, 194021,
Россия; E-mail: belashov.andrey.93@gmail.com

2 – Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

3 – Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 199034, Россия

Фотодинамическая терапия – один из методов лечения некоторых онкологических, кожных и инфекционных заболеваний, основанный на оптическом возбуждении молекул фотосенсибилизатора, проникающего внутрь клетки, и последующей генерации синглетного кислорода и свободных радикалов [1]. Одной из важных особенностей данного метода является возможность гибкой регуляции дозы и режима фотодинамического воздействия на клетку и результата такого воздействия. Так в зависимости от мощности и длительности облучения, а также области накопления фотосенсибилизатора, могут наблюдаться процессы некроза, апоптоза или аутофагии. Данная работа посвящена мониторингу морфологических изменений в клетках линии HeLa методами цифровой голографической микроскопии при различных режимах фотодинамического воздействия.

В отличие от обычной оптической и флуоресцентной микроскопии, основанной на регистрации пространственного распределения флуорофоров или показателя поглощения клетки, голографическая микроскопия позволяет визуализировать распределение фазового запаздывания волнового фронта, прошедшего через нее [2]. Это достигается за счет обработки картины интерференции объектной и опорной волн, зарегистрированной на ПЗС камере. Анализ информации о фазовом набеге клетки позволяет численно описать форму клетки, ее объем, распределение показателя преломления, а также проследить динамику изменения этих параметров. Нами с помощью голографических методов было проведено исследование изменений морфологических характеристик клетки индуцированных фотодинамическим воздействием. Для генерации синглетного кислорода внутри живых клеток линии HeLa использовался фотосенсибилизатор Радахлорин. Возбуждение молекул фотосенсибилизатора проводилось с помощью непрерывного лазерного излучения на длине волны 650 нм, при различной плотности мощности и длительности облучения. В результате работы было показано, что в ходе некроза происходит экспоненциальное уменьшение среднего фазового набега внесенного клеткой. В то же время при низких дозах облучения, напротив, происходят морфологические изменения характерные для апоптоза и данный параметр увеличивается.

1. Agostinis P. et al. Photodynamic therapy of cancer: an update // *CA: a cancer journal for clinicians*. – 2011. – Т. 61. – №. 4. – С. 250-281.

2. Kemper B., von Bally G. Digital holographic microscopy for live cell applications and technical inspection // *Applied optics*. – 2008. – Т. 47. – №. 4. – С. A52-A61.

**ПРИРОДНЫЕ ХЛОРОФИЛЛЫ: ХИМИЧЕСКИЕ
ПРЕВРАЩЕНИЯ И БИМЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ**
Natural chlorophylls: chemical transformations and biomedical applications

Михаил Грин, Андрей Мионов

Московский технологический университет, Москва, 119571, Россия;

E-mail: Michael_grin@mail.ru; Тел. +7-499-246-05-55 (доп.878)

Большой интерес к гидрированным аналогам порфиринов – хлорофиллам и бактериохлорофиллам – обусловлен широким спектром полезных свойств их модифицированных производных. Уникальная способность природных пигментов избирательно накапливаться в опухолевых тканях и вызывать под действием лазерного облучения флуоресценцию, либо фотодинамический эффект успешно используется в флуоресцентной диагностике (ФД) и фотодинамической терапии (ФДТ) злокачественных новообразований.

Рассмотрены методы направленной химической модификации природных хлорофиллов с целью получения фотосенсибилизаторов (ФС) с улучшенными фотофизическими характеристиками и повышенной гидрофильностью, а также создания конъюгатов с другими биоактивными молекулами для реализации флуоресцентной диагностики и бинарных методов терапии в онкологии.

Получены катионные ФС на основе пурпуринимида и бактериопурпуринимида для антибактериальной фотодинамической терапии, которые обладают высокой антибактериальной эффективностью против биопленок, играющих существенную роль в инфекционной патологии, формируя очаги хронической инфекции. Дополнительным преимуществом предлагаемых ФС является то, что их спектральная полоса поглощения имеет максимум в диапазоне 700–800 нм, в котором собственное поглощение биологических тканей невелико. Это позволяет эффективно воздействовать и осуществлять лечение очагов инфекции с глубокой инфильтрацией в ткани.

Повышение результативности (ФДТ) в онкологии непосредственно связано с увеличением селективности накопления ФС в опухолевой ткани. В настоящем докладе рассмотрены два возможных подхода к таргетной доставке пигментов в опухоль. Для активного таргетинга ФС в опухоль при раке предстательной железы получен конъюгат с векторным пептидом на простатический специфический мембранный антиген (PSMA), который сверхэкспрессирован на клетках рака предстательной железы. Для пассивного таргетинга ФС в опухоль получены наночастицы золота, ковалентно связанные с ФС за счет остатка липоевой кислоты, а также наночастицы золота и магнетита, покрытые плуроником (Pluronic F127), с нековалентно иммобилизованными пигментами.

На основе бактериохлоринов и нафталимидных красителей получены бихромформные системы, являющиеся моделями терапестиков – лекарственных средств, которые наряду со способностью к селективному накоплению в раковых клетках имеют интенсивную флуоресценцию, позволяющую диагностировать места накопления препарата. Значительная разница в поглощении света красителем и фотосенсибилизатором позволяет реализовать раздельно флуоресцентную диагностику и фотодинамическое воздействие за счет использования лазеров с перестраиваемой длиной волны возбуждения.

В работе реализован один из основных принципов создания новых лекарственных веществ, заключающийся в химической модификации лидерного соединения, диалкоксибактериопурпуринимида, путем введения алкильных заместителей разной длины на периферию макроцикла без изменения структуры фармакофора.

**УЧАСТИЕ ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ NF-κB И РАСТВОРИМОЙ
ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ В ГЕНЕРАЦИИ NO В НЕЙРОНАХ И
ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ФД-ВОЗДЕЙСТВИИ**
**Involvement of transcription factor NF-κB and soluble guanylate cyclase in
generation of NO in neurons and glial cells during photodynamic treatment**

Вера Ковалева, Станислав Родькин, Елена Бережная, Мария Негинская

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Иванковского ЮФУ, Ростов-на-Дону,
Ростовская область, 344090, Россия;
E-mail: vdkovaleva@sfedu.ru; Fax: +7(863)-223-08-37.

Фотодинамический (ФД) эффект – повреждение окрашенных клеток под действием света в присутствии кислорода – используется для разрушения злокачественных клеток в онкологии. Но при ФД терапии опухолей мозга также повреждаются здоровые нейроны и глиальные клетки. Поэтому актуальна проблема защиты здоровых клеток от фотоповреждения. Оксид азота (NO) – важный посредник, осуществляющий антидромную сигнализацию в нервной системе и регулирующий повреждение и выживание клеток при действии экзогенных факторов. Ранее было показано, что ФД-воздействие вызывает как морфологические изменения в рецепторе растяжения рака [1], так и изменения в продукции оксида азота (NO) [2].

Используя флуоресцентный зонд на NO DAF-2DA и модуляторы фактора транскрипции NF-κB и растворимой гуанилатциклазы (рГЦ), мы показали, что NF-κB и рГЦ участвуют в изменении уровня продукции оксида азота при ФД-воздействии на нейроглиальный препарат, рецептор растяжения речного рака. При активации NF-κB посредством Prostratin уровень продукции NO при ФД-воздействии достоверно увеличивается до 10 минуты ФД-воздействия, затем незначительно снижается. Ингибирование NF-κB посредством Parthenolid достоверно снижает уровень продукции NO с 10-й минуты и до конца ФД-воздействия. Ингибирование рГЦ посредством ODQ снижает уровень продукции NO с 15 минуты ФД-воздействия, а активация рГЦ посредством A350619 не влияет на уровень NO при облучении. При этом ингибирование NF-κB и рГЦ изменяет характер продукции NO при фотодинамическом воздействии: наблюдается медленный рост, тогда как в контрольных препаратах уровень флуоресценции DAF-2DA сначала резко увеличивается до 20-й мин воздействия, а затем незначительно уменьшается к концу ФД-воздействия.

Данные о роли модуляторов NF-κB в изменении уровня NO при фотодинамическом воздействии подтверждают ФД-индуцированную активацию iNOS и участие этой изоформы в увеличении уровня оксида азота при ФД-воздействии, а данные о снижении уровня оксида азота при ингибировании рГЦ свидетельствуют в пользу участия нейрональной NO-синтазы в продукции NO при ФД-воздействии. Таким образом, воздействуя на обе изоформы фермента можно модулировать уровень продукции NO при ФД-воздействии.

Работа поддержана грантом РФФИ №15-04-05367, а также госзаданием МОН РФ № 6.6324.2017/8.9.

1. Узденский А.Б. Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии. СПб: Наука, 2010
2. Kovaleva V. D., Uzdensky A. B. Photodynamic therapy-induced nitric oxide production in neuronal and glial cells, *J Biomed Opt.* 2016, 21(10), 105005(1–6)

**ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ДРОЖЖЕЙ
Saccharomyces cerevisiae В ПРИСУТСТВИИ ХЛОРИНА e₆
ИЛИ ЕГО КОНЬЮГАТА С МОНОКАРБОРАНОМ**
**Photodynamic inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* mediated by chlorin e₆
and its conjugate with monocarborane**

**А. А. Ковалева^{1,2}, П. А. Назаров¹, Д. А. Кнорре¹, В. А. Ольшевская³,
Е. А. Котова¹, Ю. Н. Антоненко¹**

1 – НИИ физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского МГУ
имени М. В. Ломоносова
2 – РНЦ хирургии имени академика Б. В. Петровского
3 – Институт элементоорганических соединений РАН им. А. Н. Несмеянова
E-mail: nastasiakowalewa@yandex.ru

В настоящее время остро стоит проблема преодоления множественной лекарственной устойчивости у возбудителей инфекционных болезней как бактериальной, так и грибковой природы. Перспективным методом решения данной проблемы может стать фотодинамическая инактивация микроорганизмов, которая базируется на применении фотосенсибилизаторов, увеличивающих чувствительность биологических объектов к действию света. В связи с этим усилия многих исследователей направлены на поиск новых эффективных фотосенсибилизаторов. В нашей лаборатории ранее было обнаружено, что конъюгат хлорина e₆ с монокарбораном [1] оказывает значительно более сильное фотобактерицидное действие на грамположительные бактерии, такие как *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* и *Mycobacterium sp.*, чем хлорин e₆ [2], что обусловлено более эффективным связыванием конъюгата с клетками бактерий. В настоящей работе показано, что рост дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, используемых как модель возбудителя грибковой инфекции, подавляется при освещении клеток видимым светом в присутствии хлорина e₆ в микромолярных концентрациях. При использовании в качестве фотосенсибилизатора конъюгата хлорина e₆ с монокарбораном, как и в случае с бактериями, наблюдается увеличение чувствительности *S. cerevisiae* к фотодинамической инактивации по сравнению с хлорином e₆. Также было выяснено, что некоторые мембранные АВС-транспортеры способны снижать эффективность фотодинамического действия изучаемых фотосенсибилизаторов на *S. cerevisiae*.

1. Antonenko Y. N., Kotova E. A., Omarova E. O., Rokitskaya T. I., Ol'shevskaya V. A., Kalinin V. N., Nikitina R. G., Osipchuk J. S., Kaplan M. A., Ramonova A. A., Moisenovich M. M., Agapov I. I., Kirpichnikov M. P. Photodynamic activity of the boronated chlorin e₆ amide in artificial and cellular membranes. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes* 1838 (3), 793–801, 2014
2. Omarova E. O., Nazarov P. A., Firsov A. M., Arkhipova A. Y., Moisenovich M. M., Agapov I. I., Strakhovskaya M. G., Ol'shevskaya V. A., Zaitsev A. V., Kalinin V. N., Kotova E. A., Antonenko Y. N. Carboranyl-chlorin e₆ as a potent antimicrobial photosensitizer, *PLOS ONE*, 10 (11), e0141990, 2015

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОРЕЦЕПТОРНЫХ
СВОЙСТВ КИСЛОРОДНЫХ МОЛЕКУЛ**
Investigation of photoreceptor properties of oxygen molecules

А. А. Красновский, А. С. Козлов, А. С. Бендикс

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

Молекулы кислорода являются триплетными в основном состоянии и имеют два относительно низко лежащих синглетных состояний. Переходу кислородных молекул из основного в синглетные состояния соответствуют главные полосы поглощения в ближней ИК-области 765 и 1273 нм, колебательные полосы при 690 и 1070 нм, а также целый ряд полос, принадлежащих димерам (O₂)₂ в видимой области спектра. Интенсивность этих полос у кислорода, растворенного в различных средах при нормальном давлении, очень мала, поэтому ее невозможно измерить прямыми спектрофотометрическими методами. Однако информация о параметрах полос поглощения кислорода представляет большой интерес в связи с рядом фундаментальных проблем и в том числе, для понимания механизмов лазерной терапии. Для определения параметров абсорбционных полос (оптической плотности, молярного коэффициента поглощения и поперечного сечения поглощения) растворенного кислорода в нашей лаборатории разработан комплекс фотохимических и люминесцентных методов, в основе которых лежит прямое возбуждение кислорода лазерами разных длин волн с последующей регистрацией образовавшегося синглетного кислорода с помощью химических ловушек или путем регистрации собственной ИК люминесценции кислорода. В докладе планируется суммировать основные результаты наших исследований и обсудить значение полученных данных для фотомедицины.

1. A. A. Krasnovsky, A. S. Kozlov, Ya. V. Roumbal. // *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2012, 11, 988–997
2. А. А. Красновский, А. С. Козлов. // *Биофизика*. 2014, 59, 250–257
3. А. А. Krasnovsky, A. S. Kozlov // *J. Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*. 2016, 329, 167–174
4. А. А. Krasnovsky, A. S. Kozlov // *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*, 2017, 3 (1), 010302-1-10

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ
ОЦЕНКИ ОБРАЗОВАНИЯ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА
В ВОДНЫХ СУСПЕНЗИЯХ ЛИПОСОМ**
**Application of chemiluminescence method for the evaluation of singlet oxygen in
aqueous suspensions of liposomes**

**О. Б. Любичский¹, П. В. Арбекова¹, А. Н. Осипов¹, А. С. Козлов²,
А. А. Красновский²**

1 – ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, г. Москва,
ул. Островитянова, дом 1, 117997, Россия

E-mail: olyubitsky@mail.ru; Fax: +7-495-434-11-74

2 – ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии
наук, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2, 119071, Россия

В настоящее время много внимания уделяется лазерной терапии основанной на прямом воздействии света на молекулярный кислород. Такая терапия может быть более щадящей для пациента, так как не требует введения в организм фотосенсибилизаторов. Однако эффективность такого процесса мала, из-за того, что абсорбционные полосы кислорода очень слабы [1]. Поэтому для его наблюдения необходимы сравнительно интенсивные источники ИК излучения, а также чувствительные методы регистрации синглетного кислорода непосредственно в биологических объектах.

Нами исследовано образование липидных гидропероксидов в фосфолипидной суспензии липосом при прямом и фотосенсибилизированном лазерном возбуждении растворенного в суспензиях кислорода. Для обнаружения гидропероксидов использовали регистрацию кинетики хемилюминесценции, сопровождающей разложение гидропероксидов, индуцированное ионами двухвалентного железа в присутствии физического активатора, производного кумарина C-525 [2].

При облучении суспензий лазерным излучением в видимой области спектра в присутствии тетрафенилпорфирина, димегина, фотосенса и фотодитазина мы наблюдали характерное усиление хемилюминесценции и изменение параметров ее кинетики. Тушители синглетного кислорода и ингибиторы свободных радикалов блокировали эти эффекты. Данные показывают, что под действием света происходит накопление гидропероксидов в результате окисления липидов синглетным кислородом. При прямом возбуждении кислорода лазерным излучением мощностью около 1 Вт и длиной волны 757 нм и 1272 нм, аналогичные изменения хемилюминесценции существенно слабее выражены. Чувствительность метода ограничена собственной спонтанной хемилюминесценцией липосом. Эксперименты свидетельствуют о том, что липидные мембраны являются одной из важных мишеней биологического действия синглетного кислорода, а измерение хемилюминесценции может использоваться в качестве метода исследования степени фотоповреждения липидов и анализа относительной активности фотосенсибилизаторов.

1. Красновский А. А., *Фундаментальные науки – медицине: Биофизические медицинские технологии. В 2-х томах. Том 1 / Под редакцией А.И. Григорьева и Ю.А. Владимирова*, М: МАКС Пресс, 2015, 448 с.

2. Клебанов Г. И., Любичский О. Б. и др., *Биологические мембраны*, 2002, 19(2), 160–169

РАЗРАБОТКА ТЕРАНОСТИКОВ ДЛЯ ФДТ РАКА НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ БАКТЕРИОХЛОРИНОВ И КРАСИТЕЛЕЙ С ИНТЕНСИВНОЙ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИЕЙ

А. Ф. Миронов, Д. А. Притьмов, М. А. Грин

Московский технологический университет, Институт тонких химических технологий, Москва, 119571, Проспект Вернадского 86, Россия
E-mail: mironov@mitht.ru

Одной из актуальных задач при разработке новых неинвазивных методов диагностики и терапии в онкологии, среди которых заметное место занимает фотодинамическая терапия рака, является создание супрамолекулярных комплексов, обладающих хорошей тропностью к опухолям, интенсивной флуоресценцией и высокой фотоцитотоксичностью. С целью разработки подобных тераностиков нами осуществлён синтез группы конъюгатов на основе производных бактериохлорофилла *a* с нафталимидными, стирилнафталимидными, а также цианиновым красителями [1, 2]. Были использованы два доступных бактериохлорофилла *a* с нафталимидными, стирилнафталимидными, а также цианиновым красителями [1, 2]. Были использованы два доступных бактериохлорофилла *a* с нафталимидными, стирилнафталимидными красителями с максимальной флуоресценцией в области 430–680 нм и карбоцианиновый краситель с интенсивным максимумом флуоресценции при 672 нм. Разработаны методы получения конъюгатов, изучены их спектральные и фотофизические свойства, включая процессы переноса энергии и электрона, а также генерации синглетного кислорода. Выполнены предварительные биологические испытания *in vitro* и *in vivo*.

Оптимальные характеристики были получены в случае триады, состоящей из N,N'-ди(карбокисипентил)дикарбоиндоцианина и двух молекул 13'-бактериоаминоэтиламида. Найденные величины квантовых выходов генерации синглетного кислорода (30%) и флуоресценции (0.035), позволяют рассматривать синтезированный конъюгат в качестве перспективного тераностика для флуоресцентной визуализации и последующей фотодинамической терапии злокачественных новообразований.

Работа поддержана грантом РФФИ №16-13-10092.

1. Panchenko P. A., Sergeeva A. N., Fedorova O. A., Fedorov Y. V., Reshetnikov R. I., Schelkunova A. E., Grin M. A., Mironov A. F., Gediminas Jonusauskas. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2014, 133, 140–144.
2. Grin M. A., Toukach P. V., Tsvetkov V. B., Reshetnikov R. I., Kharitonova O. V., Kozlov A. S., Krasnovsky A. A. Mironov A. F. *Dyes and Pigments*. 2015, 121, 21–29.
3. Laura Francés-Soriano, Marina A. Zaharko, María González-Béjar, Pavel A. Panchenko, Vicente Herranz-Pérez, Dmitriy A. Pritmov, Mikhail A. Grin, Andrey F. Mironov, Jose M. Garcia-Verdugo, Olga A. Fedorova and Julia Pérez-Prieto. *Angewandte Chemie*, 2017, in press.

КЛЕТОЧНАЯ И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ HDAC1 И HDAC2 В ПЕРИОД ВОССТАНОВЛЕНИЯ ТКАНИ МОЗГА ПОСЛЕ ИШЕМИИ Cellular and intracellular localization of HDAC1 and HDAC2 in brain regeneration period after ischemia

Мария Негинская, Светлана Демьяненко

Академия биологии и биотехнологии, Южный Федеральный Университет, Ростов-на-Дону, 344090, Россия
E-mail: nma@sfnedu.ru

Гены HDAC1 и HDAC2 имеют высокую степень сходства (82% аминокислотной последовательности идентичны у HDAC1 и HDAC2), что предполагает высокую степень сходства в их клеточной, внутриклеточной локализации и функциональных особенностях. Однако полученные нами данные указывают на различия в внутриклеточном распределении HDAC1 и HDAC2 в нейронах и астроцитах после ишемии. В нашем исследовании была использована модель фототромботического инсульта, которая воспроизводит ишемическую закупорку микрососудов мозга, не вызывая глубоких и обширных повреждений как в модели окклюзии среднелобовой артерии. Кроме того, нас интересовали более поздние периоды реперфузии (3 и более суток) и области мозга, участвующие в процессах восстановления ишемического повреждения (неповрежденная область ипсилатерального, контралатерального полушарий сенсомоторной коры мозга и гиппокампа). HDAC1 присутствовала не только в ядрах, но и в цитоплазме нейронов и астроцитов исследованных отделов мозга через 3, 7, 14 и 21 сутки после ишемии, что указывает на возможное участие HDAC1 в деацетилировании негистоновых белков. HDAC2 имела преимущественно ядерную локализацию в нейронах и ядерно-цитоплазматическую в астроцитах коры мозга, но не гиппокампа через 3, 7 и 14 суток после ишемии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-04-01135-а «Роль гистондеацетилаз в постишемическом восстановлении мозга».

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ЭМБРИОНЫ И СПЕРМУ РЫБ
Investigation of the mechanisms of the biological effect of optical radiation on
embryos and fish sperm**

**Виталий Плавский, Николай Барулин, Мустафа Лиман, Сергей Роговцов,
Сергей Бушук, Игорь Леусенко, Александр Микулич**

Институт физики НАН Беларуси, Минск, 220072, Республика Беларусь;
E-mail: v.plavskii@ifanbel.bas-net.by; Fax: +37517-284-08-79

Исследование механизмов биологического действия оптического излучения представляет неподдельный интерес для специалистов различного профиля: физиков-лазерщиков, фотобиологов, врачей-физиотерапевтов, а в последнее время и для ихтиологов. В настоящей работе показано, что использование гидробионтов (эмбрионов и спермы рыб) является удобной моделью для проведения таких исследований. Выполненные эксперименты позволяют сделать следующие выводы.

1. Максимальный стимулирующий эффект на размерно-весовые характеристики и показатели жизнестойкости молоди рыб наблюдается при воздействии линейно-поляризованного излучения; фотобиологический эффект, индуцируемый в том же дозовом интервале светом естественной поляризации (т.е. неполяризованным), значительно менее выражен; величина стимулирующего действия циркулярно-поляризованного излучения занимает промежуточное значение.

2. Биологические эффекты, индуцируемые линейно-поляризованным излучением монохроматического лазерного и квазимонохроматического светодиодного источников, практически не отличаются.

3. Реакция сперматозоидов и эмбрионов рыб на воздействие оптического излучения одинаковой средней плотности мощности зависит от режима облучения (непрерывный, квазинепрерывный и импульсный: наносекундный и пикосекундный), включая зависимость от частоты модуляции (F) излучения по интенсивности. Максимальный стимулирующий эффект наблюдается при $F = 50-100$ Гц, минимальный – при $F = 1-2$ Гц.

4. Биологический эффект сильно зависит от длины волны воздействующего излучения и наблюдается, в том числе, при воздействии излучения вне полос поглощения молекулярного кислорода в ближней инфракрасной области спектра.

5. Получены прямые подтверждения жидкокристаллического характера строения сперматозоидов рыб: показано, что приложение постоянного магнитного поля изменяет динамику движения спермиев после их активации водой и влияет на глубину проникновения лазерного излучения в сперму рыб, что может быть обусловлено изменением структуры клеток под действием магнитного поля.

6. Среди фотофизических процессов резонансной и нерезонансной природы (ориентационное действие света; действие градиентных сил; диполь-дипольные взаимодействия; термооптические процессы), способных вызывать фотобиологические эффекты, зависящие от таких лазероспецифических характеристик, как поляризация и когерентность, определяющее влияние в изучаемых в настоящей работе процессах принадлежит ориентационному действию света и диполь-дипольным взаимодействиям.

**ФОТОДИНАМИЧЕСКИЙ ФАКТОР НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ
Photodynamic tumor necrosis factor**

Виолетта Пурцхванидзе¹, Юрий Симаков²

1 – Медицинский центр высоких технологий «Лазервита»; Москва, Россия.
E-mail: violetta@laservita.ru

2 – Московский государственный университет технологий и управления
им. К. Г. Разумовского (ПКУ), Москва, Россия. E-mail: usimakov@yandex.ru

После проведения фотодинамической терапии (ФДТ) клетки злокачественных опухолей погибают, и из них выделяется комплекс «некротормонов» или аутонозоды, которые мы можем назвать фотодинамическим фактором некроза опухолей (ФФНО). ФФНО так действует на выжившие после ФДТ раковые клетки, что они входят в состояние некроза и апоптоза. Мы поставили перед собой задачу проводить противораковую терапию так, чтобы поразились оставшиеся раковые клетки – как в первичном очаге, так и в отдаленных метастазах. С этой точки зрения ФДТ обладает всеми необходимыми свойствами. Ранее, другими исследователями было показано, что ФДТ вызывает гибель опухолевых клеток как путем апоптоза, так и путем некроза [2]. Считается, что в этом процессе важную роль играют цитокины, лейкоциты [1] и Т-лимфоциты, которые активизируются под влиянием ФФНО. Облучение при ФДТ первичного очага привитой опухоли у крыс приводило также к исчезновению очагов метастазов. Клинический случай регрессии опухоли в необлученных очагах ангиосаркомы наблюдался, если только один очаг опухоли был облучен с помощью ФДТ [3].

В наших исследованиях за последние 5 лет после проведения многократных ФДТ мы изучили 7 клинических случаев (с цитологическим анализом) подавления основной опухоли и метастазов, не подвергнутых лазерному воздействию. Данные о них приведены в таблице.

№ п/п	Возраст	Пол	Диагноз	Кол-во сеансов ФДТ	Результаты цитологического анализа злокачественных клеток после ФДТ
1	39	♀	Рабдомиосаркома бедра	6	Некроз миосаркомы, капли жира
2	39	♀	Рак молочной железы	4	Некроз, апоптоз, капли жира
3	40	♀	Рак молочной железы	10	Некроз
4	46	♂	Меланома	8	Дегенерация раковых клеток
5	42	♀	Меланома	8	Некроз, капли жира.
6	71	♂	ПРК голени	6	Некроз, клеточный дендрит
7	42	♂	Рак языка	8	Некроз

Таким образом, можно говорить о том, что существует аутонозодная память о проведенной ФДТ. Вот эту память мы и попробуем передать раковым клеткам, находящимся не только в основной опухоли, подвергнутой ФДТ, но и тем, которые образуют метастазы. Это позволит создать новый тип «вакцины» от рака и сарком.

Данные, полученные в нашей работе, открывают новый путь борьбы со злокачественными образованиями на основе фотодинамического фактора некроза опухолей (ФФНО).

1. Пурцхванидзе В.А., Симаков Ю.Г., *Современная наука*, 2016, №5, 83–87

2. Bassi P., *Surg Oncol*, 2002, Vol. 11, P. 77–83

3. Thong P. S., Ong K. W., Goh N. S. at al., *Lancet. Oncol.*, 2007, Vol. 8, 950–952

**ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ РЕГИСТРАЦИИ КОНЦЕНТРАЦИИ
НОВОГО ИК ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ДЛЯ ФДТ В ТКАНЯХ С
ПОМОЩЬЮ ДИФФУЗИОННОГО ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО ТОМОГРАФА**
Optimization of the registration conditions of the concentration of a new IR
photosensitizer for PDT in tissues using diffusive fluorescent tomography

**Михаил Самцов¹, Дмитрий Тарасов¹, Наталия Казачкина²,
Александр Савицкий², Виктория Жердева², Александр Горященко²,
Петр Петров¹**

1 – Институт прикладных физических проблем им. А. Н. Севченко БГУ, Минск,
220045, ул. Курчатова, 7, Республика Беларусь

E-mail: samtsov@bsu.by

2 – Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

Диффузионная флуоресцентная томография является перспективным методом оптической диагностики распределения биоизондов различного назначения в организме подопытных животных *in vivo*. Нами осуществляется разработка фотосенсибилизатора нового поколения на основе симметричного индотрикарбоцианинового красителя, полоса поглощения которого расположена в окне прозрачности биотканей и обладает высоким молярным коэффициентом поглощения в этой полосе [1]. Работа посвящена выяснению оптимальных условий, которые обеспечивают возможность корректной регистрации концентрации фотосенсибилизатора в тканях *in vivo* фотосенсибилизатора с помощью диффузного флуоресцентного томографа.

Проведено сопоставление данных распределения красителя в тканях *in vivo* с помощью диффузионного флуоресцентного томографа FMT 4000 и спектрометра с вводом флуоресценции с помощью оптического волокна, а также путем экстракции бутанолом. Показано, что при достижении совпадения спектров флуоресценции красителя в калибровочном фантоме и в тканях *in vivo*, при одноэкспоненциальной кинетике затухания и совпадении времени жизни флуоресценции в фантоме и образцах крови подопытных животных можно корректно определять концентрацию красителя с помощью томографа в тканях подопытных животных. Установлено, что линейное соответствие средней по объему фантома интенсивности флуоресценции с концентрацией флуорофора в фантоме при использовании до 0,5 мкМ красителя обеспечивает адекватное определение концентрации красителя в тканях. Показано, что отклонение от линейности проявляется в изменении формы спектра флуоресценции красителя в фантоме и тканях *in vivo*. Показано, что томограф можно использовать для регистрации концентрации нового красителя в тканях при ограничении дозы введенного фотосенсибилизатора и осуществлении контроля формы спектра исследованного соединения.

1. Lugovski A., Samtsov M., Kaplevsky K., Tarasau D., Voropay E., Petrov P., Istomin Y.,
J. of Photochem. and Photobiol. A, 2016, 316 (3), 31

**ВЛИЯНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ С БЕЛКАМИ ПЛАЗМЫ КРОВИ
НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАКТЕРИСТИКИ ПОЛИМЕТИНОВЫХ
ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ ДЛЯ ФДТ**
Effect of binding with the blood plasma proteins on spectral characteristics of
polymethine photosensitizers for PDT

**Михаил Самцов¹, Иван Хлудеев², Владимир Зорин², Евгений Воропай¹,
Петр Петров¹**

1 – Институт прикладных физических проблем им. А. Н. Севченко БГУ, Минск,
220045, ул. Курчатова, 7, Республика Беларусь

2 – Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

E-mail: samtsov@bsu.by; Fax: +375-17-212-41-44

Полиметиновые красители (ПК) являются перспективными соединениями для использования в качестве фотосенсибилизаторов (ФС). Наличие интенсивной длинноволновой полосы поглощения, соответствующей «окну прозрачности» биологических тканей, способствует увеличению глубины повреждения ткани-мишени при фотодинамическом воздействии. Однако ПК – это гидрофобные соединения, склонные к агрегации в водной среде, в том числе в плазме крови, что может приводить к изменению их спектральных и фотофизических характеристик. С другой стороны, многие ФС в крови образуют комплексы с белками сыворотки, что также может влиять на степень агрегации ФС.

Цель работы – изучение влияния связывания ПК с белками сыворотки крови на спектральные и фотофизические характеристики полиметиновых красителей *in vitro*.

В работе исследованы индотрикарбоцианиновые красители, синтезированные в лаборатории спектроскопии НИИПФП им. А. Н. Севченко БГУ, которые отличаются отсутствием (ПК1) или наличием заместителей у двух карбоксильных групп молекулами полиэтиленгликоля с молекулярной массой 300 кДа (ПК2). Данные ПК имеют сходные спектральные характеристики, но если ПК1 – гидрофобный ФС, то ПК2 является водорастворимым соединением. Гель-хроматографический анализ распределения ПК между белками плазмы крови показал, что ПК1 образует комплексы преимущественно с сывороточным альбумином (САЧ), тогда как около 20% ПК2 связывается с липопroteинами высокой и низкой плотности. С использованием метода тушения флуоресценции показано, что расположение мест связывания на молекуле САЧ для исследуемых катионных ПК отличается от мест связывания, характерных для анионных хлоринов. Максимум спектра поглощения ПК в водном растворе (ФСБ pH 7,4) смещен в коротковолновую область, что характерно для агрегированной формы ПК. При титровании раствором сыворотки наблюдается bathochromic сдвиг данных полос (с 704 до 730 нм для ПК1, и с 709 до 729 нм для ПК2), что говорит о процессе мономеризации ПК. Длинноволновой сдвиг полосы поглощения ПК достигает максимальных значений при концентрациях сыворотки $\geq 1\%$ для ПК1 и $\geq 2\%$ для ПК2. Полученные результаты свидетельствуют о существенном влиянии комплексообразования с белками плазмы крови на спектральные характеристики полиметиновых красителей, что необходимо учитывать при разработке протоколов использования этих соединений в фотодинамической терапии.

**ДИНАМИКА ИМПУЛЬСНОГО ЛАЗЕРНОГО ВОЗБУЖДЕНИЯ
ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА РАДАХЛОРИН И ГЕНЕРАЦИИ СИНГЛЕТНОГО
КИСЛОРОДА С ВЫСОКИМ ВРЕМЕННЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ**
Dynamics of pulsed laser excitation of Radachlorin photosensitizer and singlet
oxygen generation with high temporal resolution

**И. В. Семенова, В. П. Белик, Д. М. Бельтюкова, О. С. Васютинский,
И. М. Гаджиев**

Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе РАН, ул. Политехническая, 26,
Санкт-Петербург, 194021; E-mail: Irina.Semenova@mail.ioffe.ru

Синглетный кислород (СК) играет ключевую роль в фотодинамической терапии различных заболеваний, прежде всего онкологических. Поэтому информация о динамике его образования и деградации в биологических средах чрезвычайно важна. Регистрация люминесценции СК на длине волны около 1270 нм является наиболее прямым методом его детектирования. Однако интенсивность сигнала люминесценции СК очень мала. Кроме того, поскольку в подавляющем большинстве случаев в фотодинамической терапии генерация СК осуществляется с помощью фотосенсибилизаторов (ФС), то его однозначное детектирование и мониторинг требуют надежного разделения сигналов люминесценции СК и ФС. Это не всегда возможно, если регистрация осуществляется только по интенсивности сигнала люминесценции в полосе вблизи 1270 нм [1, 2].

Настоящая работа посвящена исследованию спектра и времен жизни люминесценции водного раствора ФС Радахлорин в ближнем ИК спектральном диапазоне. Возбуждение осуществлялось импульсными лазерами на длине волны 405 или 660 нм, в двух основных полосах поглощения ФС. Регистрация сигнала люминесценции производилась ИК ФЭУ (Hamamatsu H10330B-45) с областью чувствительности 950–1350 нм, работающим в режиме счета фотонов. Спектральное разделение сигнала люминесценции осуществлялось монохроматором с обратной дисперсией 4,8 нм/мм. Временные зависимости сигналов люминесценции исследовались с использованием техники время-корреляционной спектроскопии (TCSPC).

Было показано, что спектр люминесценции водного раствора ФС Радахлорин в ИК области представляет из себя континуум и содержит слабо выраженные максимумы в области 940 нм и 1274 нм. Первый пик скорее всего связан с полосой фосфоресценции из нижнего триплетного состояния ФС в основное состояние. Второй пик представляет собой сигнал люминесценции СК. При этом отношение сигнала СК к фону (люминесценции ФС) в области длин волн 1258–1300 нм составляет порядка 40%. Времена жизни люминесценции ФС и СК составили 2,0 и 3,4 мкс соответственно. Проведено сравнение результатов, полученных при возбуждении на двух длинах волн. Полученные результаты могут быть использованы для оптимизации протоколов фотодинамической терапии.

1. H. J. C. M. Sterenberg, J. de Wolf, M. Koning, B. Kruijt, A. van den Heuvel, D. J. Robinson. Phosphorescence-fluorescence ratio imaging for monitoring the oxygen status during photodynamic therapy, *Opt. Express*. 12, 1873–1878 (2004)
2. S. Lee, L. Zhu, A. M. Minhaj, M. F. Hinds, D. H. Vu, D. I. Rosen, S. J. Davis, T. Hasan. "Pulsed diode laser-based monitor for singlet molecular oxygen". *Journal of Biomedical Optics*, 13, 034010-034010-8 (2008).

**ФОТОДИНАМИЧЕСКИЙ ФАКТОР НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ
(ФФНО) – ДЕЙСТВИЕ НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ В КУЛЬТУРЕ**
Photodynamic tumor necrosis factor (FNO) – action on tumor cells in culture

Юрий Симаков¹, Виолетта Пурцхванидзе²

¹ – Московский государственный университет технологий и управления им. К. Г. Разумовского (ПКУ), Москва, Россия; E-mail: usimakov@yandex.ru
² – Медицинский центр высоких технологий «Лазервита»; Москва, Россия
E-mail: violetta@laservita.ru

Исследовали воздействие препаратов, полученных из капли крови больных с рабдомиосаркомой, раком шейки матки (р.ш.м), карциномой легких и внутрикожных метастазов рака почки, после проведения ФДТ и поступления в кровь ФФНО, на культуры опухолевых клеток CCL-136, HeLa, A-459 (из коллекции культур тканей «ФНИЦЭМ им И.Ф. Гамалеи»). ФФНО подвывает опухоли у мышей [1, 2]. Препараты готовили по методу получения гетеронозодов (до пятого разведения с потенцированием) [3]. Цель работы – выявить особенности воздействия препаратов с ФФНО на цитологические показатели опухолевых клеток для последующего использования их в терапии рака и саркомы.

Табл. Воздействие препаратов с ФФНО на клетки злокачественных опухолей

Показатели и время после ФДТ	Однотип. ФФНО	CCL-136 (30 мин)		HeLa (72 часа)		A-459 (72 час)	
		Рак ш.м. ФФНО	Однотип ФФНО	Рак почки ФФНО	Однотип ФФНО	Рк ш.м. ФФНО	
МИ в	Д	75,3	75,3	88,4 ± 6,5	88,4 ± 6,5	57,6 ± 2,9	57,6 ± 2,9
%	Ф	некроз	42,7	23,7 ± 3	47,1 ± 5,6	27,1 ± 3,6	41,3 ± 3,3
Адгезия %	Д	17,8	17,8	21,1 ± 2,5	21,1 ± 2,5	26,7 ± 4,1	26,7 ± 2,5
	Ф	некроз	20,2	25,2 ± 2,8	20,8 ± 4,2	14,8 ± 2,2	24,4 ± 3,1
МТТ усл. ед.	Д	не иссл.	не иссл.	0,4 ± 0,036	0,4 ± 0,036	0,8 ± 0,04	0,8 ± 0,04
	Ф	не иссл.	не иссл.	0,19 С ₄	0,24 С ₄	0,5 С ₃	0,6 С ₃

МИ – митотический индекс; МТТ – тест на жизнеспособность клеток; Д – до ФДТ; Ф – после ФДТ; С_x – разведение с наибольшей активностью; жирный шрифт – достоверная разница по Стьюденту (P < 0,05), (повторность опытов трехкратная).

Действие препаратов с ФФНО, полученных из капли крови взятой из пальца больной рабдомиосаркомой, исследовали на культуру клеток рабдомиосаркомы (CCL-136) в процессе проведения ФДТ (ФС-Фотодитазин, лазер Элломед, при 25 Дж/см²). На цитологических препаратах, окрашенных метиленовым голубым, выявлен некроз клеток саркомы в культуре. При использовании препаратов с ФФНО от больных раком ш.м. некроз клеток в культуре CCL-136 снижен, так же, как и снижается МИ (см. табл.). В остальных экспериментах исследовали действие ФФНО на культуру раковых клеток HeLa и A-459 через 72 часа после ФДТ. При всех вариантах опыта показано, что действие препаратов с ФФНО полученных из крови больных с опухолью, соответствующей культуре раковых клеток, более эффективно, по сравнению с действием ФФНО от разнокачественных опухолей. Таким образом, при разработке новых методов терапии злокачественных опухолей по принципу гетеронозодов на основе ФФНО предпочтительнее использовать «вакцины» приготовленные из того же вида опухоли, которая поразила человека.

1. Кудинова Н. В., Березов Т. Т., *Российский биотерапевтический журнал*, 2010, №1, т. 9, 69
2. Korbelik M., Sun J., Posakony J., *Photochem. Photobiol.* 2001, Vol. 73, 403–409
3. Симаков Ю. Г., Мезенцева М. В. и др. *Инновации и инвестиции*. 2015. №6. 186–190

**ФОТОДИНАМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В БИСЛОЙНОЙ
ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЕ: РАСПРЕДЕЛЕНИЕ КИСЛОРОДА
И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ**
Photodynamic processes in bilayer lipid membrane: singlet oxygen distribution
and efficiency of photosensitizers

**В. С. Соколов¹, А. Н. Гаврильчик¹, О. В. Батищев¹, С. А. Акимов¹,
Т. Р. Галимзянов¹, Д. Князев², Р. Pohl², Ю. Г. Горбунова¹**

¹ – Институт физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН, Москва, 119071, Россия

E-mail: sokolovvs@mail.ru, Fax: +7-495-9525582

² – Institute of Biophysics, Johannes Kepler University Linz, Austria

Для совершенствования метода фотодинамической терапии раковых заболеваний важную роль имеют исследования фотосенсибилизаторов *in vitro*, позволяющие изучить их способность связываться с мембраной клетки и генерировать синглетный кислород, а также диффузию синглетного кислорода к молекулам мишеней, которыми являются липиды и мембранные белки. В настоящей работе эти процессы изучались на модели клеточной мембраны – бислойной липидной мембране (БЛМ). С помощью оригинального метода измерения разности граничных потенциалов БЛМ изучены адсорбция фотосенсибилизаторов на мембране, а также их фотодинамическая эффективность. Фотосенсибилизаторами служили сульфированные производные порфирина и алюмофталоцианина. Концентрацию адсорбированных молекул в мембране определяли методом флуоресцентной корреляционной микроскопии. Показано, что фталоцианины с 3 и 4 сульфогруппами расположены на границе мембраны с водой, а фталоцианины с 1 или 2 сульфогруппами погружаются в мембрану, так что атом алюминия расположен в мембране глубже сульфогрупп. Для определения фотодинамической активности фотосенсибилизаторов в мембрану вводили мишени синглетного кислорода, окисление которых регистрировалось по изменению создаваемого ими скачка дипольного потенциала. Такими мишенями были стирильные красители di-4-ANEPPS или RH-421 [1]. Показано, что и стирильные красители, и фталоцианины в больших концентрациях могут быть тушителями синглетного кислорода. Эффективность фталоцианинов и как фотосенсибилизаторов, и как тушителей синглетного кислорода возрастала с уменьшением числа сульфогрупп в структуре молекулы. Скорость разрушения молекул di-4-ANEPPS, адсорбированных с той же (цис) стороны мембраны, где находились молекулы фталоцианина, была значительно ниже скорости молекул di-4-ANEPPS, адсорбированных на противоположной (транс) стороне мембраны. Это объясняется более эффективным тушением синглетного кислорода молекулами di-4-ANEPPS на цис стороне мембраны. Разработана теоретическая модель диффузии и тушения синглетного кислорода в мембране, которая объясняет различную эффективность его тушения с цис и транс стороны.

Поддержано проектом Российского научного фонда № 14-13-01373.

I. V. S. Sokolov, A. N. Gavrilchik, A. O. Kulagina, I. N. Meshkov, R. Pohl, and Y. G. Gorbunova. *J.Photochem.Photobiol.B* 2016, 161:162.

**ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ПОЛИЕНОВЫХ
АНТИБИОТИКОВ “АМФОТЕРИЦИН В”**
Photosensibilizing properties of polyenic antibiotics “Amphotericin B”

**Антонина Третьякова, Александр Микулич, Виталий Плавский,
Валерий Кнюкшто, Людмила Плавская, Игорь Леусенко, Владимир Улащик**

Институт физики НАН Беларуси, Минск, 220072, Республика Беларусь

E-mail: v.plavskii@ifanbel.bas-net.by; Fax: +37517-284-08-79

Антимикробная и противогрибковая фотодинамическая терапия – относительно новый метод лечения широкого круга заболеваний, особенно актуальный при наличии резистентности у патогенной микрофлоры к действию антибиотиков и антисептиков. Цель настоящей работы – обоснование возможности использования полиенового антибиотика «Амфотерицин В» (в лекарственной форме «Фунгизон») в качестве фотосенсибилизатора для реализации методов противогрибковой фотодинамической терапии. В работе показана возможность усиления фунгицидного действия антибиотика за счет использования его способности выступать в качестве фотосенсибилизатора при воздействии излучения синей области спектра, соответствующей полосе поглощения лекарственного препарата. Достоинством сочетанного действия антибиотика и света является отсутствие резистентности у патогенной микрофлоры к деструктивному действию интермедиатов, генерируемых сенсибилизатором. Показано, что в зависимости от типа биосубстрата его повреждение, сенсибилизированное амфотерицином, может реализовываться как по радикальному механизму, так и с участием синглетного кислорода. На это указывает выраженное снижение эффекта фотоинактивации при внесении в облучаемую смесь акцепторов и доноров электронов (цистин, NAD⁺), а также при переходе от водных растворов к тяжелой воде. В случае преобладающего участия синглетного кислорода в фотохимических реакциях следовало бы ожидать резкого увеличения фотобиологического действия при замене H₂O на D₂O вследствие увеличения на порядок времени жизни синглетного кислорода. В этой связи наблюдаемое снижение эффекта сенсибилизированной амфотерицином фотоинактивации ферментов при облучении растворов в присутствии азидата натрия может быть также обусловлено тушением азидом возбужденных состояний антибиотика. Сенсибилизированная амфотерицином генерация синглетного кислорода подтверждена регистрацией стационарной люминесценции при 1270 нм в дейтерометаноле (квантовый выход $\phi_{\Delta} \approx 0,04$), а также в водных средах с помощью флуоресцентного зонда SOSG – специфичного флуоресцентного сенсора ¹O₂. Способность указанного антибиотика выполнять функцию сенсибилизатора продемонстрирована также и на клеточном уровне с помощью МТТ-теста. Показано, что при воздействии лазерного излучения синей области спектра (соответствующего полосе поглощения амфотерицина) на клетки, преинкубированные с сенсибилизатором, наблюдается их зависимость от дозы фотодеструкция (снижение выживаемости). При моделировании контактного дерматита на депилированных участках кожи крыс установлено, что воздействие излучения, соответствующего полосе поглощения амфотерицина, вызывает двукратное усиление его фунгицидного действия. Полученные результаты могут найти широкое применение в медицинской практике для лечения грибковых поражений кожи, полости рта, женской половой сферы и др.

**ФОТОТРОМБОТИЧЕСКИЙ ИНСУЛЬТ: ЭКСПРЕССИЯ
СИГНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ В ПЕРЕХОДНОЙ ЗОНЕ**
Photothrombotic stroke: Expression of signaling proteins in the penumbra

А. Б. Узденский, С. В. Демьяненко

Лаборатория молекулярной нейробиологии, Южный федеральный университет,
пр. Стачки, 194/1, Ростов-на-Дону, 344090, Россия
E-mail: auzd@yandex.ru; тел. +7(905)4287254

Одно из неонкологических применений фотодинамического эффекта – фототромботический инсульт мозга (ФТИ). При ишемическом инсульте (более 80% всех инсультов) окклюзия сосудов и дефицит кислорода и глюкозы за минуты вызывают инфаркт ткани. Спасти клетки в ядре инфаркта нереально. Но в течение нескольких часов повреждение распространяется на окружающие ткани. Это дает время для защиты нейронов в переходной зоне (пенумбре). Но пока нейропротекторные препараты не найдены. ФТИ – перспективная модель для изучения механизмов ишемического инсульта и поиска нейропротекторов. При ФТИ после инъекции гидрофильный фотосенсибилизатор бенгальский розовый не проникает в клетки и остается в кровотоке. Лазерное облучение мозга вызывает окклюзию сосудов и инфаркт мозговой ткани. Для исследования нейродегенеративных и нейропротекторных процессов в коре мозга крысы через 1, 4 или 24 часа после облучения мы изучили экспрессию более 200 сигнальных белков в 2-мм кольце вокруг 3-мм ядра ФТИ (диодный лазер 532 нм, 64 мВт/см², 30 мин) с помощью протеомных микрочипов (Panorama Antibody Microarray – Cell Signaling (Sigma-Aldrich)). Наибольшие изменения экспрессии сигнальных белков в пенумбре по сравнению с необработанной контралатеральной корой обнаружены через 4 часа после ФТИ. Наблюдалось повышение уровня белков разных клеточных подсистем: белков, иницирующих, регулирующих или выполняющих разные стадии апоптоза: p38, JNK, c-мус, p53, Par4, E2F1, p75, GADD153, GAD65/67, NMDAR2a, каспаз 3, 6 и 7, Bcl-10, AIF, SMAC/DIABLO, PSR. Одновременно экспрессировались антиапоптотические белки Bcl-x, p63, p21WAF-1, MDM2, ERK5, MKP-1 и NEDD8. Так же повышались уровни сигнальных белков, регулирующих метаболизм и выживаемость клеток: кальмодулин, CaMKII α , CaMKIV, ERK1/2, МАКАРК2, РКC α , РКC β , РКC μ , RAF1, протеинфосфатазы 1 α , ATF2, и рецепторов EGF и эстрогенов. Сверхэкспрессия бета-амилоида, предшественника амилоида APP и никастрина, участвующего в расщеплении APP, указывала на сходство механизмов быстрой нейродегенерации при инсульте и медленной – при болезни Альцгеймера. Некоторые из этих белков могут быть потенциальными мишенями для противоишемической терапии.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-15-00068) и госзаказом Министерства образования и науки (грант № 6.4951.2017/6.7).

**АМИНОАЛКИЛАМИДНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ХЛОРИНА e₆ КАК
ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ И ПЕРЕНОСЧИКИ НАНОЧАСТИЦ БОРА**
**Aminoalkylamide derivatives of chlorin e₆ as photosensitizers and carriers of
boron nanoparticles**

**Алексей Феофанов^{1,2}, Анастасия Ефременко^{1,2}, Анастасия Игнатова^{1,2},
Игорь Сиваев³, Владимир Брегадзе³, Андрей Миронов⁴, Михаил Грин⁴**

1 – Биологический факультет Московского государственного университета
имени М. В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия

E-mail: avfeofanov@yandex.ru; 8(495)939-57-38

2 – Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и
Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, 117997, Россия

3 – Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН, Москва,
119334, Россия

4 – Московский технологический университет, Москва, 119454, Россия

В докладе обсуждается влияние аминоалкиламидных заместителей различной структуры на свойства хлорина e₆, как фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии рака и носителя для доставки наночастиц бора в раковые клетки.

Установлено, что введение аминоалкиламидного заместителя позволяет в десятки раз увеличить способность хлорина e₆ проникать и накапливаться в раковых клетках, и пропорционально накоплению усилить фотоиндуцированную цитотоксичность. Показано, что увеличение длины алкильной цепи усиливает эти эффекты. Структура аминоалкиламидного заместителя может быть дополнительно изменена в ограниченных пределах без существенной потери активности фотосенсибилизатора. Конъюгаты аминоалкиламидных производных хлорина e₆ с наночастицами бора обеспечивают эффективную доставку в раковые клетки атомов бора, при сохранении флуоресцентных свойств и фотодинамической активности хлоринового макроцикла. Аналогичное влияние аминоалкиламидного заместителя обнаружено и для бактериохлоринового хромофора.

Аминоалкиламидные производные хлорина e₆ являются уникально активными фотосенсибилизаторами для ФДТ рака, а их конъюгаты с наночастицами бора – полифункциональными агентами для ФДТ, бор-нейтронзахватной терапии рака и флуоресцентной навигации. Аминоалкиламидный заместитель можно рассматривать, как вектор, усиливающий доставку различных порфириновых производных в раковые клетки.

ВЫБОР ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Е. В. Филоненко, А. Д. Каприн

МНИОИ им. П.А.Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России

Проблема борьбы со злокачественными новообразованиями остается приоритетной для современного общества. По прогнозам ВОЗ за 1999–2020 гг. заболеваемость и смертность от онкологических заболеваний во всем мире возрастет в 2 раза, поэтому разработка и внедрение новых, высокотехнологичных методов ранней диагностики и лечения рака являются наиболее актуальными. Одними из таких методов являются флюоресцентная диагностика (ФД) и фотодинамическая терапия (ФДТ).

В МНИОИ им. П. А. Герцена экспериментальные работы по изучению возможностей методов ФД и ФДТ ведутся с 1986 г. Несмотря на многолетние активные экспериментальные исследования, в клинике ФД и ФДТ опухолей получили развитие в России только с 1992 г., когда была создана лекарственная форма первого отечественного фотосенсибилизатора (ФС). В этом же году в МНИОИ им. П.А.Герцена были начаты работы по клиническому применению ФД и ФДТ. На первом этапе работы были определены методические подходы к разработке медицинских технологий: определены оптимальные сроки проведения ФД и ФДТ с каждым из ФС; показано, что ряд ФС (фотогем, препараты на основе хлорина Еб, аласенс-индуцированный ППХ) быстро выводятся из опухолевой ткани вследствие чего их можно использовать для проведения однокурсовой или многокурсовой ФДТ, другие (фотосенс) длительно задерживаются в опухоли что позволяет проводить повторные сеансы ФДТ после однократного введения препарата (продолгованная ФДТ); определено, какие эффекты реализуются при проведении ФДТ с различными препаратами – непосредственное разрушение опухолевых клеток, или ишемический некроз вследствие разрушения богатой сосудами стромы опухоли. С учетом полученных данных были разработаны запатентованные методики ФД и ФДТ. Методики ФД и ФДТ явились основой для разработки медицинских технологий ФД и ФДТ, которые были применены для диагностики и лечения нескольких тысяч больных с различной стадией и локализацией опухолевого процесса.

Результаты применения медицинских технологий показали их высокую эффективность. При лечении предрака и рака стадии T1N0M0 полная регрессия получена у больных раком слизистой оболочки полости рта и языка – в 64,4% наблюдений, у больных раком желудка – в 72,6%, у больных раком пищевода – в 77,1%, у больных центральным раком легкого – в 86,5%, у больных раком кожи – в 99,6-100%, у больных раком шейки матки – в 84-100%, у больных с патологией вульвы – в 92,5%.

Разработанные технологии паллиативной ФДТ позволили улучшить качество и увеличить продолжительность жизни в наиболее сложной категории онкологических больных. При применении продолгованной ФДТ у больных с внутрикожными метастазами рака молочной железы и меланомы полная регрессия опухолей получена в 39,3% и 38% соответственно, частичная – в 46% и 52,4%. Проведение многокурсовой ФДТ у больных стенозирующим раком пищевода и кардии позволило устранить дисфагию и восстановить естественный режим питания у 100% больных, а проведение продолгованной внутриплевральной ФДТ у больных с мезотелиомой и метастатическими поражениями плевры - добиться стойкого прекращения внутриплевральной экссудации у 92% больных при сроке наблюдения до 3,5 лет.

Разработанные медицинские технологии ФД с препаратом аласенс позволили уточнять границы опухолевого поражения при планировании хирургического лечения и ФДТ, а также эффективно выявлять скрытые очаги раннего первичного и поверхностного рецидивного рака кожи и слизистой оболочки полых органов.

Таким образом, применение ФД и ФДТ в лечении онкологических больных показало высокую эффективность и перспективность для широкого внедрения в клиническую практику.

АНТИМИКРОБНЫЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ МЕРОЦИАНИНА 540: ИССЛЕДОВАНИЯ *IN VITRO* И *IN VIVO* Antimicrobial photodynamic effects of merocyanine 540: *in vitro* and *in vivo* studies

Татьяна Шмиголь¹, Елена Сысолятина², Евгений Небезин¹, Очир Мигяев¹,
Светлана Ермолаева², Вадим Негребецкий¹

1 – ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России Москва, 117997, Россия

E-mail: tatishtish@hotmail.com; Fax: +7(495)4340465

2 – ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика

Н. Ф. Гамалеи Российской академии медицинских наук, Москва, 123098, Россия

Мероцианин 540 (МЦ540) – анионный фотосенсибилизатор, используемый для фотоинактивации микроорганизмов. В водных растворах МЦ540 может присутствовать в мономерной и димерной формах. При добавлении солей происходит формирование крупных агрегатов МЦ540, обнаруживаемых методом резонансного светорассеяния (РСР) [1].

Антимикробная фотодинамическая эффективность МЦ540 в различных формах изучена по отношению к двум разным клинически изолированным штаммам (*Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*) *in vitro*. Кроме того, был оценен терапевтический эффект антимикробной фотодинамической терапии (ФДТ) *S. aureus* на модели раневой инфекции *in vivo*.

В исследованиях *in vitro* было показано, что форма (мономер, димер или агрегаты), в которой находится краситель, влияет на скорость фотосенсибилизированной (546 нм) инактивации бактерий. В 0,25 М растворе хлорида натрия, в котором МЦ540 формирует крупные агрегаты, скорость гибели *S. aureus* возрастала примерно в 25 раз, а *P. aeruginosa* – примерно в 15 раз по сравнению с инактивацией этих же штаммов в воде, где МЦ540 находится в мономерной и димерной формах [2].

В исследовании эффективности ФДТ-МЦ540 на модели раневой инфекции *in vivo* нами обнаружено, что при проведении ФДТ в присутствии хлорида натрия на 7 сутки наблюдается не только гибель *S. aureus*, но и значительно ускоряется процесс заживления ран: для ФДТ-МЦ540-NaCl диаметр раны составил 1×1 мм, ФДТ-МЦ540-вова 1,5×2,5 мм, контрольная группа (без терапии) 4×5 мм.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-33-00970 мол_а.

1. Тихомиров А., Шмиголь Т., Кожина Е., Кягова А., Бездетная Л., Потапенко А., *Биофизика*, 2009, 54, 824

2. Т. А. Шмиголь, В. А. Бехало, Е. В. Сысолятина, Е. В. Нагурская, С. А. Ермолаева, А. Я. Потапенко. *Acta Naturae*, 2011,3 № 4 (11), 112

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ
НАКОПЛЕНИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ С РАЗЛИЧНОЙ
ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРОЙ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ**
Comparative study of cellular uptake of photosensitizers with different chemical structure

**Илья Яковец^{1,2,3}, Кирилл Борисов¹, Игорь Янковский¹, Ирина Кравченко¹,
Татьяна Зорина¹, Lina Volotine^{2,3}, Владимир Зорин^{1,4}**

1 – Белорусский государственный университет, 220030, пр. Независимости 4, Минск, Беларусь

E-mail: i.yakovets@gmail.com; Tel: +375-017-226-59-47

2 – Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), CNRS UMR 7039, Université de Lorraine, Campus Sciences, 54500, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

3 – Institut de Cancerologie de Lorraine, 54519, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

4 – Белорусский государственный университет, МГЭИ БГУ, 220070, ул. Долгобродская 23, Минск, Беларусь

Результативность проведения фотодинамической терапии в значительной степени определяется процессами распределения фотосенсибилизатора (ФС) в клеточных и тканевых структурах опухоли. В связи с этим, возникает интерес к изучению процессов накопления и выведения ФС в опухолевых клетках в зависимости от физико-химических свойств препарата. Целью данной работы было изучение процессов накопления и выведения ряда хлориновых ФС в культуральных опухолевых клетках K562.

Объектом исследования были тетрапиррольные ФС хлоринового ряда: хлорин е6 (Хл е6), его производные диметилловый эфир хлорина е6 (ДМЭ) и триметилловый эфир хлорина е6 (ТМЭ), мета-тетра(гидроксифенил)хлорин (МТГФХ).

В ходе работы были проанализированы данные изучения процессов накопления и выведения ФС с различной химической структурой и клеток K562. Аппроксимация полученных данных с использованием математических моделей, описывающих процессы накопления ФС в клетках, позволила количественно сравнить вклад различных факторов на процессы накопления ФС в клеточных структурах.

Сравнительный анализ кинетик накопления ФС в клетках K562 показал, что для неполярных ФС основным лимитирующим фактором является скорость переноса молекул ФС с белков сыворотки на плазматическую мембраны клетки, в то время как для полярных – скорость переноса молекул ФС через плазматическую мембрану. Скорость выведения ФС в свою очередь определяется процессами миграции ФС в цитоплазме между внутриклеточными структурами и плазматической мембраной. Полученные в ходе работы результаты могут быть использованы для отбора различных ФС, применяемых в фотодинамической терапии, и увеличения эффективности протоколов лечения заболеваний.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (БРФФИ) (проекты № М16М-049 и № М17МС-028), Института Канцерологии Лотарингии (Нанси, Франция) и Французской «Национальной лиги по борьбе с раком (CCIR-GE)». Авторы благодарят Biolitec Research GmbH (Йена, Германия) за предоставление МТГФХ.

СЕКЦИЯ 5. БИОФОТОНИКА МОЛЕКУЛ И НАНОЧАСТИЦ

**БЫСТРАЯ ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ
МЕТОДАМИ ШИРОКОПОЛОСНОЙ ФЕМТОСЕКУНДНОЙ
РАМАНОВСКОЙ МИКРОСПЕКТРОСКОПИИ**
Broadband femtosecond Raman microspectroscopy for rapid characterization of biological objects

**Арсений Айбуш, Фёдор Гостев, Андрей Титов, Иван Шелаев,
Виктор Надточенко**

Институт химической физики им. Н. Н. Семёнова РАН, Москва, Россия

E-mail: arseny.aybush@chph.ras.ru; Tel: +7(495)939-73-47; Fax: +7(499)137-83-57

Рамановская микроспектроскопия представляет собой безметочный подход изучения химического состава материалов. Быстрые способы безметочного исследования особенно актуальны при изучении живых биологических объектов. Микроскопия с использованием нелинейных методов рамановской спектроскопии активно развивается в последние годы [1]. Современные работы показывают большой потенциал фемтосекундных лазерных импульсов, имеющих высокую пиковую интенсивность, для быстрой характеристики колебательных спектров изучаемых объектов [2]. На пути к созданию таких экспериментальных комплексов требуется обойти много сложностей, однако в результате можно получить методику, позволяющую характеризовать химический состав биологического объекта в реальном времени [3].

В данной работе продемонстрирована генерация когерентного антистоксова рассеяния света (КАРС) в биологических образцах с помощью двух фемтосекундных лазерных импульсов. В зависимости от задачи исследования были реализованы два подхода.

Первый подход предназначен для быстрого получения колебательного спектра в широком спектральном диапазоне (до 1000 1/см). При этом для получения колебательного спектра шириной ~400 1/см требуются времена на порядок меньше чем в рамановской спектроскопии, основанной на спонтанном рассеянии света. Второй подход, использующий спектральную фокусировку фемтосекундных лазерных импульсов, предназначен для сверхбыстрого сканирования биологических образцов для одной колебательной моды. Результаты обоих подходов продемонстрированы на срезах ооцитов мышей и живых ооцитах.

Работа поддержана грантом РФФИ 16-53-52046 МНТ_а.

1. A. Zumbusch, W. Langbein, P. Borri, “Nonlinear vibrational microscopy applied to lipid biology”, *Progress in Lipid Research* 52 (2013) 615–632
2. K. P. Knutsen, J. C. Johnson, A. E. Miller, P. B. Petersen, R. J. Saykally, “High spectral resolution multiplex CARS spectroscopy using chirped pulses”, *Chemical Physics Letters* 387 (2004) 436–441
3. Charles H. Camp Jr and Marcus T. Cicerone, “Chemically sensitive bioimaging with coherent Raman scattering”, *Nature Photonics*, Vol. 9 (2015), p. 295

ПРИМЕНЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ НАКОПЛЕНИЯ

ФЛУОРОФОРОВ В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ И МИТОХОНДРИЯХ

Study of fluorophore binding to mitochondria and bacterial cells by fluorescence correlation spectroscopy

**Ю. Н. Антоненко, Л. С. Хайлова, П. А. Назаров, Г. А. Коршунова,
Е. А. Котова**

НИИФХБ имени А. Н. Белозерского, МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва 119991, Россия; E-mail: antonen@genebee.msu.ru; тел. +7(495)9395149; факс: +7(495)9393181

В последние годы исследователи активно занимаются созданием и изучением митохондриально-направленных соединений в связи с перспективой их использования для лечения патологий, обусловленных дисфункцией митохондрий. Изучение связывания с митохондриями, несомненно, является чрезвычайно важным аспектом исследований митохондриально-направленных соединений, так как будучи катионами, эти соединения накапливаются в митохондриях в силу наличия на их внутренней мембране разности электрических потенциалов. Способность накапливаться в митохондриях обеспечивается присоединением к тому или иному соединению группировки, несущей делокализованный положительный заряд, например, трифенилфосфония (TRP). Связывание флуоресцирующих соединений с митохондриями и бактериальными клетками удобно изучать с помощью флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС). Нам удалось разработать вариант метода, позволяющий оценивать связывание флуорофоров не по изменению коэффициента диффузии, а путем анализа распределения интенсивности сигналов флуоресценции от отдельных частиц (Perevoshchikova et al. BBA 2008). В настоящее время мы занимаемся созданием и характеристикой митохондриально-направленных разобщителей окислительного фосфорилирования, в том числе флуоресцирующих разобщителей. Наличие флуоресценции позволяет следить за накоплением этих соединений в митохондриях. Ранее нами были синтезированы и изучены две серии флуорофоров, проявляющих свойства разобщителей – додециловый и октиловый эфиры флуоресцеина (Shcheripova et al. BBA 2014) и ряд 4-алкиламино-7-нитробензоксодиазолов (C_n NBD) с $n = 12, 10, 9, 8$ и 6 атомов углерода (Denisov et al. Bioelectrochemistry 2014). Путем присоединения децилTRP к флуоресцеину нами был впервые получен митохондриально направленный разобщитель митофлуоресцеин (mitoFluo), накопление которого в митохондриях печени крысы (Denisov et al. Chem. Commun. 2014) и клетках бактерий *Bacillus subtilis* было продемонстрировано методом ФКС. Оказалось, что необходимым условием для наличия разобщающей активности у митофлуоресцеина является достаточная длина алкильного линкера между катионом TRP и флуоресцеином. Так аналогичный конъюгат с бутильным линкером вместо додецильного значительно слабее накапливался в митохондриях и не обладал разобщающим действием (Antonenko et al. 2016). В последующей работе были синтезированы и изучены конъюгаты TRP с 7-нитробензоксодиазолом (mito-C_nNBD) с $n = 10$ и 5 атомов углерода (TRP-децил-NBD и TRP-пентил-NBD). С помощью ФКС было показано, что в отличие от серии C_n NBD, оба катионных производных NBD накапливаются в митохондриях в ответ на энергизацию. Однако лишь mito-C₁₀NBD проявлял разобщающую активность в микромолярных концентрациях, т. е. стимулировал дыхание митохондрий и снижал их мембранный потенциал.

Работа поддержана грантом РФФ № 16-14-10025.

РАЗРАБОТКА НОВЫХ ФОТОХРОМНЫХ СИСТЕМ

The design of the new hybrid photoactive systems

**Николай Беликов¹, Ольга Демина¹, Алексей Лукин², Алексей Шумский¹,
Петр Левин¹, Сергей Варфоломеев¹, Андрей Ходонов¹**

¹ – Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва, 119334, Россия
E-mail: nikolay@belikov.me; Тел.: +7(495)939-71-48

² – Московский технологический университет, Москва, 119454, Россия

A promising way for the new hybrid photoactive/photocontrollable systems and materials design consists in the covalent binding of the photochromic probes via their covalent “immobilization” on various substrates, e.g. polymers, lipids, proteins and quantum dots. Developing the new generation of photochromic probes containing substituents with appropriate functional group type will be required for the implementation of this procedure. Indoline spirobenzopyrans are one of the most studied photochromic compound classes. The structure of possible target substrates defines the nature of the reactive anchor group. Spectral properties and photochemical parameters of spirobenzopyrans depend significantly on the nature of the substituent present in the defined part of the molecule, hence, the targeted variation of substituents’ nature allows to search directly for new photochromes with given photochemical properties and various stimulus-responsive structural elements.

We developed a number of new photochromic probes and labels on the 5'-substituted spirobenzopyran scaffold. All the types of labels were prepared by the effective synthetic approach which included the direct modification of spiroopyran molecule. The choice of the target reactive group or “molecular address” was determined by type and nature of the target structure. The following conjugation procedure variants were used: a) covalent binding of the probe molecule with target binding site by self-recognition principle (bacteriorhodopsin); b) noncovalent binding of the probe molecule with target by the recognition of “molecular address” part, which was introduced in label (TxA₂ receptor inhibitors); c) covalent binding of the probe molecule with target by terminal selectively reactive group (HS-group for CdSe Quantum Dots); d) covalent binding of the probe molecule with target by terminal reactive group [1–5].

This work was partly supported by RFBR Grant (project № 16-03-00571a).

- Laptev A.V., Belikov N.E., Lukin A.Yu., Barachevsky V.A., Alifimov M.V., Demina O.V., Varfolomeev S.D., Shvets V.I., Khodonov A.A., *High Energy Chemistry*, 2008, 42, 601
- Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Zemtsov R.V., Barachevsky V.A., Demina O.V., Varfolomeev S.D., Shvets V.I., Khodonov A.A., *High Energy Chemistry*, 2010, 44, 211
- Zvezdin K.V., Belikov N.E., Laptev A.V., Lukin A.Yu., Demina O.V., Levin P.P., Brichtkin S.B., Spirin M.G., Razumov V.F., Shvets V.I., Khodonov A.A., *Nanotechnologies in Russia*, 2012, 7 (5), 308
- Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Zvezdin K.V., Demina O.V., Barachevsky V.A., Varfolomeev S.D., Khodonov A.A., Shvets V.I., *Rus. Chem. Bull.*, 2014, 63 (9), 2026
- Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Barachevskii V.A., Demina O.V., Khodonov A.A., Varfolomeev S.D., Shvets V.I., *Mendeleev Commun.*, 2013, 23 (3), 145

Влияние модификации хромофорной группы на спектральные свойства ретинальсодержащих белков
The effect of chromophoric group modification on the spectral properties of retinal proteins

Николай Беликов¹, Ольга Демина¹, Лада Петровская², Владимир Чупин³, Алексей Лукин⁴, Петр Левин¹, Дмитрий Соловьев³, Игорь Чижов⁵, Алексей Шумский¹, Сергей Варфоломеев¹, Андрей Ходонов¹

1 – Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва, 119334, Россия

E-mail: nikolay@belikov.me; Тел.: +7(495)939-71-48

2 – Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, 117997, Россия

3 – Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Московская область, 141701, Россия

4 – Московский технологический университет, Москва, 119454, Россия

5 – Institute for Biophysical Chemistry, Hannover Medical School, Hannover, 30625, Germany

The retinoid isomers play the key role in functioning processes of retinal proteins – bacteriorhodopsin, halorhodopsin, tundra-rhodopsin, visual pigments and others, as well as in the retinoic acid nuclear receptors. Upon absorption of light quantum, the isomerization of the definite double bond initiates a cascade of events needed for the generation of the physiological or chemical responses. During the evolution process, this property of retinoid molecule became the basis for light quantum energy transformation into chemical energy or some physiological response in biological systems, both in higher animals and microorganisms. Retinal proteins contain a number of defined retinal isomers as part of their chromophoric groups bound via the protonated aldimine bond with the ϵ -amino group of the Lys residue. The following objects were studied: 1) bacteriorhodopsin (BR) – relatively well studied light-driven proton pump from the extremely halophilic microorganism *Halobacterium salinarum*, for which a whole arsenal of modern methods for determining structure-function relationship has been developed in past 30 years, and 2) tundra-rhodopsin (ESR) – the new specimen of retinal containing proteins – an unique proteorhodopsin from microorganism *Exiguobacterium sibiricum*, isolated from permafrost aged about three million years [1]. A tundra-rhodopsin (ESR) new retinal protein – light driven proton pump from the psychrotrophic bacterium *Exiguobacterium sibiricum* has a Lys96 as a proton donor moiety to the Schiff base that distinguishes ESR from related retinal proteins – bacteriorhodopsin (BR), proteorhodopsins (PRs), and xanthorhodopsin (XR), in which the donor function is performed by Asp residues with a carboxyl side chain. We studied the effect of tundra-rhodopsin chromophoric group's nature on its structure and function.

This work was partly supported by RFBR Grant (project № 16-04-01264a).

1. Petrovskaya L. E., Lukashev E. P., Chupin V. V., Sychev S. V., Lyukmanova E. N., Kryukova E. A., Ziganshin R. H., Spirina E. V., Rivkina E. M., Khatypov R. A., *FEBS Letters*, 2010, 584 (19), 4193

Многофотонная фемтосекундная лазерная спектроскопия молекулярных зондов
Multiphoton femtosecond laser spectroscopy of molecular probes

О. С. Васютинский¹, М. Э. Сасин¹, А. Г. Смолин¹, П. С. Штернин¹, S. Herbrich², C. Oswald², К.-Н. Gericke²

1 – Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе РАН, Санкт Петербург, 194121, Россия

E-mail: osv@pms.ioffe.ru, Fax: +7(812)297-10-17

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

Представлен обзор результатов теоретических и экспериментальных исследований поляризованной флуоресценции молекулярных зондов, возбуждаемой посредством двухфотонных переходов, инициированных возбуждением двухцветными фемтосекундными импульсами лазера.

В качестве молекулярных зондов были исследованы растворы органических молекул, которые в настоящее время активно используются в био-медицинских приложениях: индол, триптофан и NADH (никотинимид аденин динуклеотид). Поляризованная флуоресценция возбуждалась при одновременном поглощении молекулами двух лазерных импульсов с перестраиваемыми длинами волн, что позволило обеспечить суммарную энергию возбуждения, изменяемую в диапазоне 4,04–7,09 эВ. Используя различные комбинации поляризаций всех трех фотонов, участвующих в фотопроцессе, был определен набор молекулярных параметров, описывающих динамику фотопроцесса. Анализ полученных результатов был проведен на основе неэмпирических расчетов структуры возбужденных состояний исследованных молекулы и матричных элементов вертикальных переходов.

Выяснено, что значения молекулярных параметров очень чувствительны к свойствам микроокружения и позволяют исследовать тонкие детали процессов переноса энергии в возбужденных состояниях молекул, включая анизотропные распределения осей молекул, времена жизни, времена корреляции, а также динамику безызлучательных переходов. В докладе показано, что исследование поляризованной флуоресценции молекулярных зондов, встроенных в биологические структуры, позволит получить качественно новый канал получения информации о структуре белков, их фолдинга и гидратации, а также о механизмах окислительно-восстановительных реакций в живых организмах.

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

3. S. Herbrich, K.-H. Gericke, A. G. Smolin, O. S. Vasyutinskii, *J. Phys. Chem. A* 2014, 118, 5248

4. S. Herbrich, T. Al-Hadhuri, K.-H. Gericke, P. S. Shternin, A. G. Smolin, O. S. Vasyutinskii, *J. Chem. Phys.* 2015, 142, 024310

5. О. С. Васютинский, А. Г. Смолин, С. Oswald, К. Н. Gericke, *Оптика и спектр.* 2017, 122 (4), 622

РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ СОЛНЕЧНОЙ ЯЧЕЙКИ НА ОСНОВЕ ДИОКСИДА ТИТАНА И РАЗЛИЧНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПИГМЕНТОВ

Р. А. Волошин¹, М. В. Родионова¹, С. К. Жармухамедов^{1,2},
С. И. Аллахвердиев^{1,2,3}

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

2 – Институт фундаментальных проблем биологии, РАН, Пушкино, Московская обл., Россия

3 – Кафедра физиологии растений, Биологический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия
E-mail: suleyman.allakhverdiev@gmail.com; тел. +7(925)131-69-96

Разработка электрохимических солнечных ячеек (СЯ), в том числе и ячеек на основе биологических пигментов, является активно развивающимся направлением в альтернативной энергетике. СЯ исследовались при различных температурах, интенсивностях и спектральном составе света. Более того, для того чтобы понять процессы, происходящие в СЯ, требуется также изучать эффективность и стабильность ячейки по отношению к факторам окружающей среды. Для этой цели была разработана и сконструирована новая установка для изучения действия факторов окружающей среды на фототок, генерируемый СЯ. Данная система может быть моделью, которая отражает условия, необходимые для эффективного и стабильного функционирования солнечной ячейки. Предварительные результаты были получены для двух типов фотосенсибилизаторов: препаратов тилакоидных мембран и экстрактов из плодов малины, обогащенных антоцианами. Было показано, что электрогенная активность уменьшается на половину при 40°C и вновь возвращается к первоначальному значению при последовательном снижении температуры. Максимальный ток, полученный с использованием СЯ на основе тилакоидных мембран, был равен 0.46 μA , в то время как максимальный ток, генерируемый СЯ на основе антоциановых пигментов, был равен 1.75 μA . Целью данного исследования является поиск новых способов повышения эффективности и стабильности СЯ на основе биологического материала. В будущем такая измеряющая установка может быть использована для изучения СЯ на основе длинноволновых форм хлорофилла (Хл *d* и *f*), а также компонентов фотосинтетического аппарата, содержащих эти формы хлорофилла.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-14-00039).

ФОТОДЕСТРУКЦИЯ ФОЛАТОВ: МЕХАНИЗМЫ, ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

Александр Воробей

Институт физики НАН Беларуси, пр. Независимости, 68, Минск, 220072. Беларусь
E-mail: avorobey@tut.by; Tel: +375-172-84-28-69; Fax: +375-172-08-79

Фолаты участвуют в качестве коэнзимов в синтезе ряда аминокислот и оснований нуклеиновых кислот в клетках, что определяет их важную роль для нормального роста и развития тканей. При гиповитаминозе, вызванном недостатком фолатов в организме, увеличивается риск развития сердечно-сосудистых, опухолевых, нейродегенеративных и ряда других заболеваний [1]. Одной из возможных причин дефицита фолатов в организме человека и животных, является фотодеструкция фолатов под действием поглощаемого ими УФ-излучения экологического диапазона (УФА), которое возрастает в окружающей среде и используется в медицине и в косметических целях.

Вместе с тем, фотохимия фолатов в биологических препаратах пока мало изучена. Известно [2], что при облучение фолатов в водных средах УФА светом (максимум поглощения фолатов в области 365 нм) происходит разрыв ковалентной связи между *p*-аминобензоил-L-глутаматом и 6-формилптеринном, который при дальнейшем облучении окисляется до птерин-6-карбоксильной кислоты. Образующие птерины обладают ярко выраженной флуоресценцией в области 400–500 нм (с максимумом при 445 нм). Образование аналогичных фотопродуктов наблюдается и при облучении фолиевой кислоты (ФК) видимым светом в присутствии порфиринов. Однако кинетические зависимости фотодеструкции ФК при фотосенсибилизируемом порфирином воздействии и при облучении УФА светом различны. В отличие от линейной зависимости накопления птеринов в первом случае, при облучении ФК УФА светом наблюдается экспоненциальное нарастание флуоресценции птеринов, что является следствием фотосенсибилизации разрушения ФК образуемыми продуктами (птеринами). Оба процесса блокируются при удалении кислорода из раствора и ингибируются азидом натрия, что свидетельствует об их реализации с участием синглетного кислорода.

При повышенной локальной концентрации фолатов в клетках, например при интенсивной экспрессии фолатных рецепторов, связывающих ФК в мембранах пролиферативно активных эмбриональных клеток, логарифмическое нарастание концентрации птеринов уже при низкой дозе УФА облучения чревато гибелью клетки. Высокая же концентрация фолатных рецепторов во многих типах опухолевых клеток позволяет использовать фотодеструкцию фолатов для разработки эффективных методов опосредуемой ФК фотодинамической терапии опухолевых заболеваний. Следует отметить, что изучение фотосенсибилизируемого разрушения фолатов имеет практическое значение также в связи с разработкой фотохимических методов их определения в биологических средах.

1. Luccock M. *Mol. Genet. Metab.* 2000, 71 (1), 121.

2. Off M.K., Steindal A.E., Porojnicu A.C., Juzeniene A., Vorobey A., Johnsson A., Moan. *J. Photochem. Photobiol., B: Biology.* 2005, 80, 47.

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ЗОНДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ БИОЛОГИИ ЦИНКА Fluorescence probes in zinc biology investigation

Юлия Гармаза, Александр Тамашевский, Екатерина Слободжанина

ГНУ “Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси”, 220072 Минск, Беларусь

E-mail: garmaza@yandex.ru; Fax: +375-17-284-23-59

Появление высокоспецифичных флуоресцентных зондов для определения содержания ионов цинка в цитозоле и различных компартментах клеток позволило достигнуть большого прогресса в исследовании биологии цинка. К настоящему времени обнаружено, что ионы цинка имитируют действие гормонов, ростовых факторов, цитокинов, функционируют как нейромедиаторы, выступая в качестве “сигнальной молекулы”. При этом допустимая концентрация цинка в сыворотке крови человека составляет порядка 2–15 мкМ, в то время как свободных внутриклеточных ионов цинка в большинстве клеток чрезвычайно низкий (от пМ до нМ). Цель работы – используя флуоресцентный подход, исследовать связь цинкового гомеостаза с функционированием эритроцитов человека, в частности с индукцией эриптоза.

В работе использована кровь здоровых доноров (в качестве антикоагулянта использовали гепарин). Для определения внутриклеточной концентрации лабильного пула Zn^{2+} использовали флуоресцентные зонды FluoZin-3-AM и FluoZin-3-TS (Molecular Probes). Процент “эриптогических” клеток оценивали с помощью FITC-конъюгированного рекомбинантного аннексин-V (Beckman Coulter). Цитозольную эстеразную активность эритроцитов оценивали с помощью флуоресцентного красителя кальцеина-AM (Sigma). Образование свободнорадикальных соединений оценивали с помощью флуоресцентного зонда 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата ($H_2DCF\text{-}DA$, Sigma). Измерения были выполнены на спектрофлуориметре “Cary Eclipse” (Varian) и на проточном цитометре FACScan (BD).

Используя специфический ионофор, внутриклеточный и внеклеточный хелаторы для Zn^{2+} , продемонстрировано существование специфических рецепторов на поверхности эритроцитов и внутриклеточных депо, отвечающих за поддержание цинкового гомеостаза. В то же время было показано, что увеличение цитозольного пула лабильного Zn^{2+} свыше 100 нМ приводит к запуску процессов эриптоза, а цитотоксические эффекты (ингибирование цитозольной эстеразной активности, перераспределение фосфатидилсерина на внешний монослой мембраны) цинка обусловлены внутриклеточными молекулярными механизмами, приводящими к выходу Zn^{2+} из клеточных депо. Выявлена обратная зависимость между изменением внутриклеточного пула лабильного цинка и эстеразной активности эритроцитов при моделировании окислительного стресса, используя пероксид водорода *in vitro*. Это свидетельствует о прямом участии Zn^{2+} в запуске эриптоза и о том, что дисбаланс “прооксиданты/антиоксиданты” в пользу первых выступает в качестве триггера данного процесса. Полученные результаты свидетельствуют о существовании механизмов регуляции цинкового гомеостаза в эритроцитах человека и узкой концентрационной грани между его “эссенциальными” и токсичными свойствами, нарушение которой может привести к запуску процессов запрограммированной клеточной гибели.

НОВЫЙ ТИП ФОТОУПРАВЛЯЕМЫХ МЕТОК ДЛЯ РАЗЛИЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ МИШЕНЕЙ New type of photo-driven labels for various biological targets

**Ольга Демина¹, Николай Беликов¹, Алексей Лукин², Петр Левин¹,
Сергей Варфоломеев¹, Андрей Ходонов¹**

¹ – ФГБУН Институт биохимической физики им. Н. М. Емануэля РАН, Москва, 119334. Россия

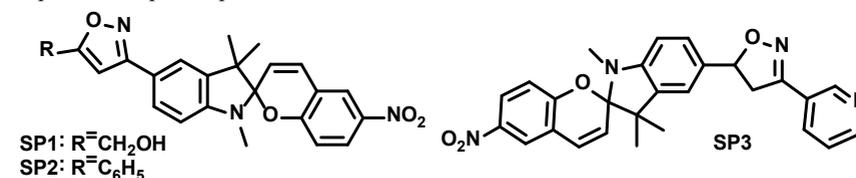
E-mail: ovd@sky.chph.ras.ru; Fax: +7(499)137-41-01

² – Московский технологический университет, 119454, Москва, Россия

Дизайн и синтез биологически активных молекул с фотохромными и/или флуоресцентными фрагментами является актуальной задачей биоорганической и медицинской химии, а применение таких молекул в биологических исследованиях дает много полезной информации для развития фундаментальной медицины и фармакологии, и практического применения [1, 2].

Нами в качестве мишени ранее был использован бактериородопсин из *Halobacterium solinarum*, а в данной работе – рецептор тромбосана A_2 тромбоцитов человека. При встраивании в бактериородопсин серии меченых хромофоров – фотохромных аналогов ретиналя, содержащих спиropирановый или дитиенилэтенный фрагменты, была продемонстрирована возможность управления процессом встраивания хромофора при воздействии на него светом определенной волны [3].

В настоящей работе в качестве мишени был выбран рецептор тромбосана A_2 поскольку ранее нами было показано, что 5-замещенные 3-пиридилизоксазолы являются его потенциальными антагонистами. Нами была синтезирована серия из трех соединений (**SP1-SP3**), содержащих «молекулярный адрес» в различной пространственной ориентации к фрагменту фотохромной метки. Было проведено изучение их спектральных характеристик и процесса связывания **SP1-SP3** с рецепторами мембраны тромбоцитов.



Связывание соединения **SP3** при использовании избытка немеченого аналога – 3-(3-пиридил)-5-фенил-4,5-дигидроизоксазола позволило выявить, что оба соединения связывались с одной и той же мишенью – рецептором тромбосана A_2 . Было показано, что наличие фрагмента «молекулярного адреса» является главным фактором для связывания данной серии соединений с рецептором тромбосана A_2 .

Работа была частично поддержана грантами РФФИ (проекты 09-04-01003 и 17-04-01326a).

- Chambers J. J., Kramer R. H. *Neuromethods*, 2011, V. 55
- Bahar I., Lezon T. R., Bakan A., Shrivastava I. *Chem. Rev.*, 2010, 110, 1463–1497
- V. A. Barachevsky, A. A. Khodonov, N. E. Belikov, A. V. Laptev, A. Yu. Lukin, O. V. Demina, S. I. Luyksaar, M. M. Krayushkin. *Dyes and Pigments*, 2012, 92(2), 831–837

СПЕКТР И ВРЕМЕНА ЖИЗНИ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ DMEM

Luminescence spectrum and lifetimes of DMEM cell culture medium

**А. А. Жихорева^{1,2}, В. П. Белик¹, А. В. Белашов¹, И. М. Гаджиев¹,
И. В. Семенова¹, О. С. Васютинский¹**

1 – Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе, Санкт-Петербург, 194021, Россия
E-mail: anna_zhikhoreva@mail.ru; Тел: +7(950)019-36-18

2 – Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 199034, Россия

В настоящее время одними из важнейших методов исследования многих биологических объектов, таких как, например, белки, аминокислоты и живые клетки, являются абсорбционная и эмиссионная спектроскопии [1]. Использование фотоэлектронных умножителей, чувствительных как в видимой, так и в ближней инфракрасной области спектра, позволяет изучать происходящие в живой клетке процессы и механизмы воздействия различных агентов на отдельные внутриклеточные структуры [2]. Одним из важных направлений исследования являются процессы, происходящие в живой клетке при образовании в ней молекул синглетного кислорода, имеющего пик фосфоресценции на длине волны около 1270 нм. Для корректного изучения этих процессов необходимо надежно выделять сигнал фосфоресценции синглетного кислорода на фоне возможной люминесценции сторонних химических веществ, например, питательной среды для культивирования клеток, поддерживающей их в нормальном физиологическом состоянии.

В данной работе проведено исследование спектров поглощения и люминесценции питательной среды DMEM. Регистрация спектра поглощения среды в видимой области проводилась спектрометром Ocean Optics. Спектр люминесценции измерялся с помощью экспериментальной установки на базе монохроматора МДР-12 с дифракционной решеткой 600 лин/мм. Возбуждение люминесценции среды DMEM производилось лазером на длине волны 405 нм, которая находится в полосе поглощения среды. Регистрация люминесценции в видимой области осуществлялась с использованием кремниевоего фотодиода, в длинноволновой области – фотоэлектронного умножителя Hamamatsu NIR-PMT H10330B-45. Полученные данные с двух детекторов сшивались по контрольным точкам в области перекрытия диапазонов чувствительности детекторов. В результате исследований был построен полный спектр люминесценции среды DMEM в видимой и ближней ИК области. Было показано, что в области полосы фосфоресценции синглетного кислорода люминесценция среды DMEM отсутствует. Полученные результаты могут быть использованы при люминесцентной диагностике распределений синглетного кислорода в клеточных структурах.

1. Leung B. O., Chou K. C. Review of super-resolution fluorescence microscopy for biology // *Applied spectroscopy*. – 2011. – Т. 65. – №. 9. – С. 967–980
2. Bacia K., Kim S. A., Schwillie P. Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells // *Nature methods*. – 2006. – Т. 3. – №. 2. – С. 83–89

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕМТОСЕКУНДНОЙ ЛАЗЕРНОЙ НАНОХИРУРГИИ И ЛАЗЕРНОГО ПИНЦЕТА В ИССЛЕДОВАНИИ МЕХАНИКИ ЖИВЫХ GV-ООЦИТОВ МЫШИ Femtosecond laser nanosurgery and laser tweezers in studying of mouse GV-oocyte mechanics *in vivo*

**Александр Залесский^{1,2}, Арсений Айбуш¹, Артём Астафьев¹,
Андрей Костров¹, Алина Осыченко¹, Мария Сырчина¹, Гаянэ Серобян¹,
Александр Шахов¹, Виктор Надточенко¹**

1 – Институт химической физики РАН, Москва, 119991, Россия

E-mail: aleksandr.zallesskij@phystech.edu; Tel: +7(945)939-73-47

2 – Московский физико-технический институт (Государственный университет),
Долгопрудный, Московская обл. 141700

В современной фотобиологии и биофотонике широко распространено использование лазерных операции на клеточном и субклеточном уровне [1–3]. Фокусировка лазерного излучения при помощи объектива с высокой числовой апертурой (0,7 и более) даёт возможность достигать высоких значений плотности мощности и обеспечить эффективное воздействие на субклеточные структуры, органеллы или клетку в целом.

В силу наличия, так называемого, окна прозрачности биологических объектов на длинах волн 700–1100 нм, ближний ИК диапазон электромагнитного излучения является наиболее подходящим для такого сорта операций. Это позволяет минимизировать негативные эффекты лазерного воздействия. В случае использования сверхкоротких лазерных импульсов, наличие окна прозрачности позволяет проводить строго локализованное воздействие на объект изучения за счёт нелинейных оптических эффектов, в силу того, что линейное поглощение практически отсутствует. Такой подход лежит в основе двух распространённых лазерных методик – лазерного «пинцета», в случае фокусировки непрерывного излучения, и лазерного «скальпеля» при использовании фемтосекундных лазерных импульсов. В настоящей работе эти методики использовались для изучения механических свойств живых ооцитов мыши на стадии герминальной везикулы. Основным объектом исследований была выбрана органелла – ядрышкоподобное тельце (ЯПТ), находящаяся внутри ядра ооцита. В работе продемонстрирована возможность исследовать перемещение ЯПТ при помощи лазерного пинцета, выявлены анизотропные свойства материала ядра и ядрышка. Была продемонстрирована возможность визуализировать взаимодействие ядрышка, ядерных и цитоплазматических структур в ооците.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-53-52046

1. Shaevitz J. [et al.] Backtracking by single RNA polymerase molecules observed at near-base-pair resolution // *Nature* – 2003. – V. 426, N 1. – P. 684–687
2. Turetsky T. [et al.] Laserassisted derivation of human embryonic stem cell lines from IVF embryos after preimplantation genetic diagnosis. // *Hum Reprod.* – 2008. – V. 23, N 1. – P. 46–53
3. Sacconi L. [et al.] Optical Micromanipulations inside Yeast Cells // *Applied Optics.* – 2005. – V. 44, N 11. – P. 2001.

СУПЕРПАРАМАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА, ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫЕ МОЛЕКУЛАМИ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ: ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С КЛЕТКАМИ РАКА ГРУДИ
Superparamagnetic iron oxide-based nanoparticles functionalized with folic acid: interactions with breast cancer cells

Анастасия Игнатова^{1,2}, Emilie Allard-Vannier³, Katel Hervé-Aubert³, Алексей Феофанов^{1,2}, Igor Chourpa³

1 – ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997, Россия
 E-mail: aignatova_83@mail.ru

2 – Биологический факультет Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия

3 – Université François Rabelais de Tours, EA 6295 Nanomédicaments et Nanosondes, UFR des Sciences Pharmaceutiques, F-37200 Tours, France

Наносистемы на основе суперпарамагнитных наночастиц оксида железа, благодаря их композиционным, магнитным и оптическим свойствам, а также их высокой способности проникать в раковые клетки, являются перспективными для применения в терапии и диагностике рака.

Нами были исследованы свойства гибридных наночастиц на основе оксида железа, покрытых полиэтиленгликолем, функционализированных молекулами фолиевой кислоты (ФК) и нагруженных нильским синим (НС) или доксорубицином (DOX). В качестве клеточной модели использовали клеточные линии с высоким (HeLa, карцинома шейки матки) и низким (MCF7, аденокарцинома молочной железы) уровнем экспрессии фолатных рецепторов (FR). Было обнаружено, что наночастицы легко проникают как в клетки HeLa, так и в клетки MCF7 и формируют сходное гранулярное распределение в цитоплазме. При этом в FR-положительных клетках уровень накопления наночастиц, несущих фолиевую кислоту, выше, чем в FR-отрицательных клетках. В клетках, инкубированных с наночастицами, флуоресценцию НС наблюдали на плазматической мембране и в небольших цитоплазматических везикулах. Флуоресценцию ФК наблюдали только внутри клетки, главным образом, в тех же везикулах, где и НС. Этот результат, а также отсутствие флуоресценции в ядрах клеток в случае наночастиц, нагруженных ковалентно связанным DOX, свидетельствует, что при накоплении в цитоплазме клеток наночастицы сохраняют свою целостность.

Показано, что почти 60% флуоресценции наночастиц с гранулярным распределением в клетках ассоциировано с лизосомами. Накопление наночастиц в лизосомах может быть терминальной стадией эндоцитоза, следовательно, остальные 40% наночастиц могут быть локализованы в эндосомах. Это предположение подтверждено тем, что внутриклеточное распределение наночастиц, нагруженных НС, значительно сококализовано с распределением флуоресцентно-меченого маркера клатриновых эндосом- трансферрина. Обнаружено снижение накопления наночастиц в клетках, предварительно обработанных хлорпромазином (ингибитор, клатрин-опосредованного эндоцитоза), но не метил-бета-циклодекстрином (ингибитор кавеоларного эндоцитоза). Таким образом, установлено, что накопление наночастиц в клетках HeLa происходит преимущественно через клатрин-зависимый механизм эндоцитоза и завершается их концентрированием в лизосомах.

Работа поддержана грантами РФФИ 16-54-76013 и Министерства национального образования, высшего образования и исследований Франции (MENESR, project №321 MINERVA) в рамках Европейской программы ERA-NET RUS PLUS.

СОЗДАНИЕ, ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ ФАНТОМОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ
Creation, optical properties and application of biological tissue phantoms

Екатерина Козлова¹, Сергей Усталков¹, Ольга Савенко¹, Анастасия Новикова¹, Вячеслав Кочубей², Александр Скапцов¹

1 – Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, 410012, Саратов, Россия

2 – Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

E-mail: kate.kozlova64@yandex.ru; Тел:+7(960)349-83-21

Для разработки новых методов диагностики и лечения рака требуется тщательного тестирования перед введением в клиническую практику. И использование натуральной ткани человека нецелесообразно по некоторым причинам [1, 2, 3]. Фантомы же являются имитацией биологической ткани, которые моделируют распространение света в биологических тканях [4]. Использование твердых не деградируемых фантомов является основой для получения надежных повторяемых экспериментальных результатов. Таким образом, изготовление твердых фантомов тканей, которые содержат наночастицы с высокой оптической плотностью или флуоресценцией, является актуальной проблемой.

Данная работа описывает изготовление и исследование оптических характеристик фантомов биологической ткани, содержащих различные нанобъекты, такие как сильно рассеивающие частицы SiO₂, квантовые точки CdSe/ZnS, золотые наностержни и апконверсионные частицы NaYF₄: Yb, Er. В ходе работы были сняты спектры люминесценции фантомов, измерена теплоемкость и температура деградации, рассчитаны коэффициенты поглощения и рассеяния.

1. Bashkatov A. N., Genina E. A., Kochubey V. I., Rubtsov V. S., Kolesnikova E. A., Tuchin V. V., *Quant. Electron.* 2014, 44, 779
2. Konyukhova J., Skaptsov A., Volkova E., Galushka V., Kochubey V., *Proc. SPIE*, 2014, 9031, 90310L
3. Lazareva E. N., Tuchin V. V., *Proc. SPIE*, 2016, 9917, 99170U.
4. Wróbel M. S., Popov A. P., Bykov A. V., Kinnunen M., Jędrzejewska-Szczerska M., Tuchin V. V., *J. Innov. Opt. Health Sci.* 2015, 8, 1541005

НОВЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ЗОНДЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ New fluorescent probes for detection of amyloid fibrils

Александр Луговский¹, Евгений Воропай¹, Михаил Самцов¹,
Александр Маскевич², Андрей Лавыш², Виталий Степуро²

1 – Белорусский государственный университет, Минск, 220030, Беларусь
E-mail: lugovski@bsu.by; Fax: +375-17-209-53-07
2 – Гродненский государственный университет им. Янки Купалы, Гродно, 230023, Беларусь

Проблема возникновения упорядоченных агрегатов – амилоидных фибрилл в настоящее время является актуальной, в связи с сопряженным с данным процессом возникновением многих тяжелых заболеваний, таких как нейродегенеративные болезни Альцгеймера и Паркинсона, прионные заболевания, злокачественная миелома и др. [1, 2]. Один из методов обнаружения и изучения амилоидных фибрилл основан на регистрации и анализе флуоресценции связанных с фибриллами зондов. В качестве флуоресцентных зондов преимущественно применяются бензтиазольные стироловые красители и их производные [3]. Нами было предложено использовать в качестве флуоресцентных зондов для определения амилоидных фибрилл бензтиазольные стироловые красители ковалентно связанные с полиэтиленгликолем со средней молекулярной массой 300 г/моль. Ранее установлено, что привитие полиэтиленгликоля к полиметиновым красителям увеличивает водорастворимость и биосовместимость модифицируемых соединений [4]. В связи с этим, проведен синтез монокарбоцианиновых и дикарбоцианиновых бензтиазольных красителей, содержащих свободную карбоксильную группу, по которой в дальнейшем осуществлена этерификация полиэтиленгликолем в одну стадию путем использования метилсульфоната 1-метил-2-бромпиридина в полиэтиленгликоле по реакции Мукаямы в присутствии фторида цезия в качестве основания. Синтезированные бензтиазольные стироловые красители отличаются от своих немодифицированных аналогов лучшей растворимостью в воде.

Проведены спектрально-люминесцентные исследования новых соединений. Установлено, что полученные соединения характеризуются чрезвычайно низким квантовым выходом флуоресценции (~0,001) в маловязких полярных растворителях. В малополярных (диоксан), а также вязких растворителях (глицерин) интенсивность свечения увеличивается соответственно в ~15 и ~150 раз. Более длинноволновое положение спектра поглощения (~540 нм) и флуоресценции (~600 нм) по сравнению с бензтиазольными стироловыми красителями и их производными делает их перспективными флуоресцентными зондами для исследования амилоидных фибрилл.

1. Carrell R. W., Goopu B., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1998, 8, 799
2. Kelley J. W., *Structure*, 1997, 5, 595
3. Lavysh A. V., *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 2016, 6(5), 1525
4. Lugovski A. A., Samstov M. P., *J. of Photochem. & Photobiol. A*, 2016, 316(3), 31

ЦИС/ТРАНС ФОТОИЗОМЕРИЗАЦИЯ И СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ФУРОКУМАРИНОВОЙ КИСЛОТЫ Cis/trans photoisomerization and spectral properties of furocoumaric acid

Михаил Малахов^{1,2}, Антон Матросов¹, Владислав Скарга^{1,3},
Елизавета Зараменских^{1,3}, Михаил Маслов³

1 – Отдел медицинской химии и токсикологии и
2 – Кафедра физики и математики, ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова, Москва, 117997, Россия; E-mail: mvmalakhov@yandex.ru; Tel: +7(916)815-5258
3 – Кафедра ХТБАС им. Н. А. Преображенского, Московский технологический университет (МИТХТ), Москва, 119454, Россия

Фурокумариновая кислота (ФКК) представляет собой минорный продукт фотоиндуцированных превращений псоралена [1], а также встречается в экстрактах Бобовых [2]. В работе [3] нами было высказано предположение, что ФКК может являться промежуточным продуктом при формировании в растворах фотоокисленного псоралена биологически активного 5-формил-6-гидроксibenзофурана [4]. В данной работе ФКК получали согласно методике, ранее описанной для ее метокси-производного [5, 6]. Псорален (1 мМ) подвергали щелочному (pH=13,4) сольволизу с формированием цис-ФКК. Затем, полученный щелочной раствор цис-ФКК облучали на воздухе УФ-А светом (365 нм; 840 Вт/м², 10 мин). В ходе цис/транс фотоизомеризации в растворе формировалась транс-ФКК. Затем, транс-ФКК извлекали из раствора путем экстрагирования хлороформом/препаративной хроматографии на силикагеле (выход 27%) и подтверждали ее строение методом ЯМР (¹H и ¹³C).

При изучении фотохимического поведения ФКК в водных растворах было обнаружено явление pH-зависимой флуоресценции транс-ФКК. транс-ФКК представляет собой двухосновную кислоту, и ее полностью протонированная форма наблюдается лишь при pH<2. Затем, с повышением pH в растворах начинает формироваться моноанион транс-ФКК по карбоксильной группе (pK₁ ~ 3,5). При pH=6 моноанион является преобладающим в растворах, а затем начинает формироваться дианион транс-ФКК (pK₂ ~ 8,5). При pH>10 транс-ФКК в растворах почти полностью депротонирована. Обнаружено, что транс-ФКК флуоресцирует во всем диапазоне исследованных значений pH (от 0,5 до 13,5). При этом максимум испускания около 485 нм, наблюдаемый при pH=0,5–1,0 (область полностью протонированной транс-ФКК), сменяется при pH>2 флуоресценцией моноаниона транс-ФКК с максимумом испускания около 460 нм и максимальной интенсивностью при pH=6,0–6,5. Дальнейшее сдвиг pH в щелочную область приводит к появлению флуоресценции дианиона транс-ФКК около 550 нм, которая особенно выражена при pH>pK₂. Заметное невооруженным глазом изменение цвета флуоресценции с голубовато-зеленого на желтый в физиологическом диапазоне значений pH=6,5–8,0 делает транс-ФКК перспективным флуоресцентным pH зондом.

1. Caffieri S., *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2002, 1 (3), 149
2. Named A. I., Sprinquel I. V., El-Emary N. A., *Phytochemistry*, 1999, 50 (5), 887
3. Небезин Е.В., Власова Н.В., Пятницкий И.А., Лысенко Е.П., Малахов М.В., *Биохимия*, 2015, 80 (6), 903
4. Marley K. A., Larson R. A., Davenport R., *ACS Symposium Series*, 1995, 616, 179
5. Décout J.-L., Lhomme J., *Photobiochem. Photobiophys.*, 1985, 10, 113
6. Mohammad T., Morrison H., *Photochem. Photobiol.*, 1994, 59 (2), 248

Люминесцентный метод контроля роста квантовых точек CuInS₂ в режиме реального времени
Luminescent method to control the growth of CuInS₂ quantum dots in real time

Аммар Мохаммед, Анастасия Новикова, Александр Скапцов

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, 410012, Саратов, Россия
 E-mail: skaptsov@yandex.ru

Квантовые точки CuInS₂ являются перспективными кандидатами для применения в биомедицине, фотокатализе, конверсии солнечной энергии и светоизлучающих диодах [1]. В последние время, наночастицы CuInS₂ начали применяться в качестве нанотермометров – люминесцентных наночастиц, характеристики спектров излучения которых зависят от температуры окружающей среды [2]. Квантовые точки CuInS₂ имеют спектр излучения в ближнем инфракрасном окне прозрачности биоткани и могут быть возбуждены светом в этом диапазоне длин волн, что делает их привлекательными для биомедицинских применений. На кристаллические структуры и оптические свойства нанокристаллов CuInS₂ можно существенно влиять, контролируя при синтезе их молярное отношение Cu:In.

Многие методы синтеза квантовых точек CuInS₂ хорошо известны [3]. Однако механизм роста таких наноструктур пока мало изучен. В настоящей работе разработан люминесцентный метод для исследования механизма роста квантовых точек CuInS₂ в реальном времени. Метод заключается в измерении спектров люминесценции при синтезе в режиме реального времени, а именно, в импульсном режиме лазерное излучение (длина волны 403 нм, плотность мощности 100 мВт) возбуждает люминесценцию реакционной смеси, измеряемую люминесцентным полихроматором QE Pro Ocean Optics, USA. Метод позволяет исследовать динамику роста с изменениями температуры, концентрации реагентов, молярного отношения Cu:In и времени синтеза. Получены зависимости спектрального положения максимума интенсивности люминесценции наночастиц от температуры реакционного раствора и времени синтеза для различных соотношений йодистой меди и реагентов ацетата индия.

1. Siemer K., Klaer J., Luck I., Bruns J., Klenk R., Braunig D. Efficient CuInS₂ solar cells from a rapid thermal process (RTP) // *Solar energy materials and solar cells*, 2001, V.67, I.1-4, P.159–166
2. Jaque D., Vetrone F. Luminescence nanothermometry // *Nanoscale*, 2012, V.4, P. 4301–4326
3. Panthani M. G., Akhavan V., Goodfellow B., Schmidtko J. P., Dunn L., Dodabalapur A., Barbara, P. F., Korgel B. A. Synthesis of CuInS₂, CuInSe₂, and Cu(In_xGa_{1-x})Se₂ (CIGS) nanocrystal “inks” for printable photovoltaics // *Journal of the american chemical society*, 2008, V.130, I.49, P. 16770–16777

ПРИМЕНЕНИЕ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК В ИССЛЕДОВАНИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ
Quantum dots applications in the study of biological systems

Виктор Надточенко, Артем Астафьев, Александр Шахов, Арсений Айбуш, Гаяне Себорян, Алина Осыченко, Мария Сырчина, Андрей Костров, Андрей Титов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической физики им. Н. Н. Семенова Российской академии наук, ул. Косыгина 4, 199991, Москва

Квантовые точки различной физико-химической природы являются перспективной системой для биомедицинских применений, благодаря присущей им уникальной, перестраиваемой фотолюминесценции, высокой их фотостабильности, наноразмерам. В данном сообщении дан обзор применения квантовых точек для визуализации биообъектов. Рассмотрены механизмы люминесценции в квантовых точках различной химической природы. Обсуждается проблема биосовместимости квантовых точек, в частности кадмий не содержащих квантовых точек. Особое внимание уделяется углеродным квантовым точкам, способам их синтеза и инъекции этих точек внутрь биологической клетки. В сообщении приводятся оригинальные данные о новом способе формирования углеродных квантовых точек внутри клетки без разрушения внешней мембраны (стенки) клетки. Сообщается о выживаемости биологической клетки после образования квантовой точки, о возможности наблюдения траектории движения точки по мере развития клетки и использовании этого метода для исследования процессов пространственной перестройки цитоплазмы и нуклеоплазмы клетки.

Работа поддержана грантом РФФИ 17-13-01506.

ВОЗМОЖНОСТИ ЛАЗЕРНОЙ НАНОХИРУРГИИ ДЛЯ РАБОТЫ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ ОБЪЕКТАМИ
Laser nanosurgery methodic for biological objects studying

А. А. Осыченко¹, А. Д. Залесский^{1,2}, А. М. Шахов¹, В. А. Надточенко¹

1 – Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН

2 – Московский физико-технический институт (государственный университет)

Лазерная нанохirurgия с применением фемтосекундных лазеров – высокоточный и малоинвазивный метод манипулирования биологическими объектами. При помощи остросфокусированного лазерного излучения можно вызывать локальное разрушение в живом объекте, размер которого будет соответствовать размеру перетяжки лазерного луча: менее 1 мкм [1]. Этот инструмент получил название «лазерный скальпель» и может использоваться для разрезания или разрушения фрагментов клетки *in vivo* без нарушения ее целостности [2], для инактивации ДНК [3] или слияния клеток [4].

В настоящей работе фемтосекундный лазерный «скальпель» совместно с методиками флуоресцентной микроскопии использовали для изучения механики и динамики слияния клеток, а так же для изучения механизма формирования тетраплоидности в слившихся клетках. В качестве модельных объектов использовали ооциты мыши на стадии метафазы II и двухклеточные эмбрионы мыши. Было показано, что перемешивание жидких компонентов цитоплазмы клеток имеет характер диффузии. Обнаружено, что после слияния тетраплоидность возникает путем «проскальзывания митоза», а не путем слияния ядер или образования общей метафазной пластинки, как было показано в других работах [5, 6]. Полученные данные представляют интерес для практических разработок в области клонирования, получения гибридов, создания реконструированных эмбрионов.

Работа была поддержана грантом РФФИ № 16-53-52046 МНТ_a.

1. Воздействие фемтосекундного лазерного излучения на ооциты млекопитающих. А. М. Шахов, А. А. Астафьев, А. А. Осыченко, В. А. Надточенко. «Химическая физика», 2016, т. 35, № 10, с. 1–4. DOI: 10.7868/S0207401X16100101
2. Tängemo C., R.P., Colombelli J., Haselmann U., Simpson J.C., Antony C., Stelzer E.H., Pepperkok R., Reynaud E.G., A novel laser nanosurgery approach supports de novo Golgi biogenesis in mammalian cells. J Cell Sci., 2011. Mar 15(124): p. 978–987
3. Шахбазян А. К, Карменян А. В., Свиридова-Чайлахян Т. А, Кривохарченко А. С., Чои А., Чайлахян Л. М. Использование лазера для получения реципиентных цитопластов при пересадке ядер у млекопитающих // Доклады Академии Наук. 2009. Т. 428 №3. С. 1–4
4. Krivokharchenko A., Karmenyan A., Sarkisov O., Bader M., Chiou A., Shakhbazyan A. Laser fusion of mouse embryonic cells and intra-embryonic fusion of blastomeres without affecting the embryo integrity // PLOS ONE. 2012. V. 7. I. 12
5. Kuetemeyer K., Lucas-Hahn A., Petersen B., Niemann H., Heisterkamp A. Femtosecond laser-induced fusion of nonadherent cells and two-cell porcine embryos // Journal of Biomedical Optics. 2011. V. 16. № 8. 088001
6. Sekirina G.G., Bogoliubova N.A., Antonova N.V., Dyban A.P. The behaviour of mitochondria and cell integration during somatic hybridisation of sister blastomeres of the 2-cell mouse embryo // Zygote. 1997. V.5. №2. P. 97–103

БИЛИРУБИН В КЛЕТКАХ ТКАНИ: ФОТОНИКА И СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА
Bilirubin in tissue cells: photonics and sensibilizing properties

Виталий Плавский, Людмила Плавская, Валерий Кнюкшто, Татьяна Ананич, Василий Катаркевич, Игорь Леусенко, Антонина Третьякова, Александр Микулич

Институт физики НАН Беларуси, Минск, 220072, Республика Беларусь

E-mail: v.plavskii@ifanbel.bas-net.by; Fax: +37517-284-08-79

Интерес к изучению фотоники билирубина и его сенсibiliзирующего действия на клетки обусловлен широким использованием фототерапии для снижения уровня билирубина при синдроме гипербилирубинемии (желтухи) новорожденных детей.

В работе показана способность билирубина проникать через мембрану животных клеток, локализоваться в митохондриях и вызывать фотосенсибилизированную гибель клеток. Определяющее влияние на летальное действие света оказывает билирубин, локализованный внутри клеток (дополнительное присутствие пигмента в питательной среде практически не сказывается на жизнеспособности клеток при их облучении). Фотобиологический эффект зависит от физиологического состояния клеток, дозы воздействующего излучения и концентрации фотосенсибилизатора. Вклад фототермических процессов в сенсibiliзированное билирубином снижение жизнеспособности клеток в выбранном интервале плотностей мощности (не более 20 мВт/см²) не значителен. При облучении клеток в отсутствие билирубина, а также при инкубации клеток с билирубином ($C_{бр} = 40$ мкМ) без светового воздействия эффект слабо выражен. Установлено, что основной интермедиат фотоповреждения клеток при их сенсibiliзации билирубином – синглетный кислород. При этом гибель клеток может быть обусловлена как прямым сенсibiliзирующим действием билирубина, так и продуктов его структурной (люмирубин) и конфигурационной (Z,E-, E,Z-билирубин) фотоизомеризации. О вкладе фотопродуктов билирубина в сенсibiliзированное повреждение клеток свидетельствует отсутствие фотобиологического эффекта на начальных стадиях дозовой зависимости. При более высоких дозовых нагрузках дозовая зависимость выживаемости клеток близка к экспоненциальной. Другая характерная особенность дозовых кривых выживаемости клеток – практически идентичный фотобиологический эффект излучения светодиодного источника с $\lambda_{\text{макс}} = 465$ нм, соответствующего максимуму спектра поглощения билирубина в комплексе с альбумином, и излучения с $\lambda_{\text{макс}} = 520$ нм, соответствующего длинноволновому склону указанного спектра. Следовательно, можно ожидать, что включение билирубина в клетки сопровождается существенными изменениями его структурных и абсорбционных характеристик. При этом флуоресценцию билирубина, локализованного в клетках, удастся зарегистрировать лишь при 77 К. Впервые показано, что включение билирубина в клетки сопровождается многократным увеличением его фотохимической устойчивости по сравнению с молекулами пигмента, связанными с альбумином. Билирубин, локализованный в животных клетках, может выполнять функцию селективного фильтра, экранирующего излучение, способное вызывать фотоизомеризацию билирубина, связанного с молекулами альбумина крови.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Ф17АРМ-028).

ВЫЯВЛЕНИЕ НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗНОЙ, КАРБОНГИДРАЗНОЙ, А ТАКЖЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФОТОСИСТЕМЫ 2 РАСТЕНИЙ

М. В. Родионова¹, С. К. Жармухамедов^{1,2}, С. И. Аллахвердиев^{1,2,3}

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

2 – Институт фундаментальных проблем биологии, РАН, Пушкино, Московская обл., Россия

3 – Кафедра физиологии растений, Биологический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия
E-mail: rodionovamv5@gmail.com; тел. +7(916)705-56-47

Медь играет значительную роль во многих метаболических процессах всех фотосинтетических организмов. Катионы меди в качестве важных микроэлементов необходимы для роста растений. Однако в высоких концентрациях медь проявляет наибольшую токсичность среди катионов тяжелых металлов. Ранее было показано, что компоненты фотосистемы 2 (ФС-2) более чувствительны к действию меди, чем фотосистема 1 (ФС-1). Известно, что медь(II) влияет на реакционные центры ФС-2, способствует разрушению хлорофилла а и водоокисляющего комплекса, ингибирует фотохимическую активность ФС-2 и вызывает нарушение структуры тилакоидных мембран. Кроме того, медь(II) катализирует окислительные повреждения за счет активных форм кислорода (АФК). Как известно, медь в комплексе с органическими лигандами лучше подавляет фотосинтетические процессы и другие клеточные реакции.

Новые 9 медьсодержащих комплексов и 4 их лиганда были первично охарактеризованы в качестве ингибиторов фотосинтетического переноса электронов в тилакоидах шпината (*Spinacia oleracea* L.). *In vitro* было оценено ингибиторное действие этих комплексов на фотохимическую и карбоангидразную активность ФС-2, а также глутатионредуктазу хлоропластов и дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*). Как известно, ФС-2 растений не только является главным источником образования АФК, но также проявляет карбоангидразную активность, предположительно связанную с марганцевым кластером. Глутатионредуктаза (ГР), как один из главных антиоксидантных ферментов, катализирует восстановление глутатиона, защищая таким образом клетки от действия АФК.

Нами было показано, что Cu(II)-комплексы подавляют активность ГР, фотосинтетическую и карбоангидразную активность ФС-2 с разной эффективностью. Кроме того, лиганды проявляют меньшую ингибиторную активность по сравнению с целыми комплексами, однако активность агентов не зависела от общего содержания меди в соединении.

В целом, синтез новых соединений, эффективно подавляющих ключевые метаболические процессы, может служить не только альтернативным подходом для решения сельскохозяйственных проблем, но и для разработки лекарственных препаратов для животных и человека.

Данное исследование было проведено при поддержке Российским Фондом Фундаментальных Исследований и Программами по молекулярной и клеточной биологии Российской Академии Наук.

АПКОНВЕРСИОННЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ ТЕМПЕРАТУРЫ Upconversion nanoparticles for temperature sensing

Елена Сагайдачная¹, Елена Волкова^{1,2}, Вячеслав Кочубей^{1,2}

1 – Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского, Саратов, 410012, Россия; E-mail: lastovskaia_e@mail.ru; volkova87@gmail.com

2 – Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, 634050, Россия

Апконверсионные наночастицы перспективны для создания датчиков температуры для исследования биообъектов. Возможность применения частиц $\text{NaYF}_4:\text{Er,Yb}@\text{SiO}_2$ определяет чувствительность интенсивностей полос зеленой люминесценции (${}^4\text{H}_{11/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$ (525 нм) и ${}^4\text{S}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$ (543 нм)) к температуре [1]. Стоит отметить, что влияние условий эксперимента по измерению люминесцентных свойств обсуждается не достаточно подробно [2, 3]. По этой причине актуальным является исследование зависимости люминесцентных свойств частиц от условий эксперимента.

Частицы $\text{NaYF}_4:\text{Er,Yb}$ были синтезированы стандартным гидротермальным методом, затем покрыты SiO_2 и отожжены при температуре 450°C. В качестве объектов исследования были использованы пленка на основе ацетата целлюлозы толщиной 12 мкм, содержащая частицы $\text{NaYF}_4:\text{Er,Yb}@\text{SiO}_2$, и эти же частицы в виде порошка.

Апконверсионную люминесценцию ионов Er^{3+} при облучении ИК лазером (980 нм, 0,7–4,3 Вт/см²) наблюдали с помощью люминесцентного спектрометра OceanOptics QE65000 (СИПА). Температуру пленки устанавливали с помощью элемента Пельтье (РТР-1 Peltier System), контролировали с помощью тепловизора IRI4010 (Великобритания).

Изменения в спектрах люминесценции пленок при изменении температуры согласуются с теоретическим описанием процесса и данными [4]. При этом важно отметить, что определяемая по спектральным данным температура не зависит от плотности мощности возбуждения.

При сравнении температуры пленок по данным элемента Пельтье и тепловизора обнаруживается нагревающее действие ИК излучения возбуждающего лазера, что согласуется с данными [1].

При облучении частиц без внешней стабилизации температуры наблюдается значительный нагрев частиц и изменение геометрии возбуждаемой области при увеличении плотности мощности возбуждающего излучения. Это приводит к изменению характера зависимости между люминесценцией и температурой.

Полученные результаты демонстрируют необходимость снижения мощности лазерного возбуждения люминесценции при применении синтезированных частиц в качестве термодатчиков.

1. Zhou, S., Deng, K., Wei, X., Jiang, G., Duan, C., Chen, Y., Yin, M., *Optics Communications*, 2013, 291, 138–142
2. Dubey, A., Soni, A. K., Kumari, A., Dey, R., Rai, V. K., *Journal of Alloys and Compounds*, 2017, 693, 194–200
3. Xi, J., Ding, M., Dai, J., Pan, Y., Chen, D., & Ji, Z., *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 2016, 27(8), 8254–8270
4. Robin G. Geitenbeek, P. Tim Prins, Wiebke Albrecht, Alfons van Blaaderen, Bert M. Weckhuysen, Andries Meijerink, *J. Phys. Chem. C.*, 2017, 121(6), 3503–3510

**Влияние танинов растительного происхождения
на функционирование белков множественной
лекарственной устойчивости в лимфоцитах человека**
**Influence of plant origin tannines on functioning of multidrug resistant proteins
in human lymphocytes**

Александр Тамашевский, Екатерина Слобожанина

ГНУ “Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси”, 220072 Минск, Беларусь; E-mail: Tayzoe@mail.ru; Tel: +375-29-77-59-153

Известно, что основным методом лечения онкогематологических заболеваний является интенсивная химиотерапия. Однако, химиотерапия часто является причиной тяжёлых побочных эффектов, а её неэффективность (особенно после рецидива) может обуславливаться феноменом множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) – невосприимчивости клеток опухоли одновременно к целому ряду лекарственных средств с широким спектром механизмов воздействия на внутриклеточные мишени. Это явление связывают с функционированием АТФ-зависимых транспортеров суперсемейства ABC, которые снижают внутриклеточную концентрацию лекарственных соединений путем их выброса из клеток с использованием энергии гидролиза АТФ. К настоящему времени у человека выявлено 48 представителей ABC суперсемейства и лишь три из них (Р-гликопротеин (P-gp), белок множественной лекарственной резистентности 1 (MRP1) и белок, ответственный за резистентность клеток рака молочной железы (BCRP)) непосредственно связаны с фенотипом МЛУ.

Таким образом, поиск селективных и нетоксичных ингибиторов белков, ответственных за формирование МЛУ клеток, представляется актуальной задачей, решение которой позволит разработать адекватные стратегии при лечении онкогематологических заболеваний человека.

Целью данной работы явилось исследование функционирования P-gp и MRP1 в лимфоцитах человека при воздействии группы танинов растительного происхождения (семейство *Euphorbia*) с возможными противоопухолевыми свойствами *in vitro*.

Установлено, что транспортная активность интегральных мембранных белков P-gp и MRP1 снижается при инкубации периферических лимфоцитов человека *in vitro* с тремя биологически активными соединениями растительной природы в концентрации 100 мкМ. Причем для P-gp снижение транспортной активности выражено в меньшей степени, чем для MRP1. Более того танины различаются внутри группы по степени ингибирования как P-gp, так и MRP1, что возможно связано с их структурно-функциональными особенностями.

Также показано, что воздействие танинов в диапазоне концентраций от 1 до 100 мкМ приводит к накоплению продукции активных форм кислорода (АФК) в лимфоцитах человека, усиливающееся с ростом концентрации данных соединений. Полученный эффект, возможно, связан с ингибированием танинами транспортной активности белка MRP1, который, как известно, способен регулировать гомеостаз окисленного и восстановленного глутатиона, т.е. способен выступать в качестве регулятора окислительно-восстановительного баланса в клетках. Данная особенность представляется интересной, т.к. в некоторых типах онкологических клеток нарушена реализация программы апоптоза за счет жесткой регуляции окислительно-восстановительного баланса.

Авторы выражают благодарность руководителю кафедры биофизики Института биологии Университета г. Белостока (Польша) профессору Замараевой Марии за предоставленные образцы танинов.

Работа поддержана БРФФИ, грант № Б16МС-011.

**Взаимодействия фермента PARP1 с нуклеосомными
наночастицами: исследования методом флуоресцентной
микроскопии одиночных молекул и их комплексов**
**Interactions of enzyme PARP1 with nucleosome nanoparticles: studies with
the method of fluorescence microscopy of single molecules and their complexes**

**Алексей Феофанов^{1,2}, Надежда Герасимова¹, Даниель Султанов¹,
Наталья Малюченко¹, Елена Котова³, Василий Студитский^{1,3},
Михаил Кирпичников^{1,2}**

1 – Биологический факультет Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия

E-mail: avfeofanov@yandex.ru; Tel: +7(495) 939-57-38

2 – Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и

Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, 117997, Россия

3 – Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, 19111-2497, USA

E-mail: vasily.studitsky@fccc.edu

Поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1 (PARP1) – один из ключевых ферментов, отвечающих за репарацию разрывов ДНК в хроматине и участвующих в транскрипции. PARP1 сверх-экспрессируется в некоторых типах рака и рассматривается как важная молекулярная мишень в противоопухолевой терапии. Структурные особенности взаимодействия PARP1 с нуклеосомами, механизмы функционирования, а также способы регуляции его активности требуют детального изучения.

Для решения этих задач нами разработаны методики анализа структуры свободно диффундирующих одиночных нуклеосомных наночастиц и их комплексов с PARP1, которые реализованы с применением конфокального микроскопа, оснащенного лавинными фотодиодами, и эффекта FRET (Фёрстеровского резонансного переноса энергии). В исследованиях использованы сконструированные нами моноклеосомы с метками Су3 (донор) и Су5 (акцептор), расположенными в соседних витках ДНК на расстоянии меньше радиуса Фёрстера.

Используя разработанные методики, нами обнаружены структурные перестройки в нуклеосомах, происходящие при образовании комплексов с PARP1. Связывание PARP1 вызывает изменения в укладке нуклеосомной ДНК, способные дестабилизировать нуклеосому и влиять на эффективность транскрипции. Эти структурные перестройки происходят без потери гистонов и ослабляются в процессе поли(АДФ)-рибозилирования. Диссоциация авто-поли(АДФ)-рибозилированного PARP1 сопровождается восстановлением исходной структуры нуклеосомы. Установлено, что олапариб, ингибитор ферментов семейства PARP, не влияет на формирование комплексов между нуклеосомой и PARP1 и на сопутствующие структурные перестройки. В то же время олапариб вызывает арест комплекса нуклеосома-PARP1, блокируя NAD⁺-опосредованную диссоциацию PARP1 за счет ингибирования авто-поли(АДФ)-рибозилирования.

Исследования поддержаны Программой фундаментальных исследований Президиума РАН и грантом РФФИ 17-54-33045.

**СОЗДАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЦЕНТРОВ В ООЦИТАХ МЫШИ
С ПОМОЩЬЮ ФЕМТОСЕКУНДНЫХ ЛАЗЕРНЫХ ИМПУЛЬСОВ**
Femtosecond laser assisted *in situ* creation of fluorescent centers inside mouse oocytes

**Александр Шахов, Артем Астафьев, Алина Осыченко, Мария Сырчина,
Арсений Айбуш, Виктор Надточенко**

Институт химической физики им. Н. Н. Семёнова РАН, Москва, 119991, Россия
E-mail: physics2007@yandex.ru, Tel: +7(495)939-73-47

Перед бионанотехнологиями и медициной остро стоит проблема визуализации клеточной активности. Распространенным методом визуализации является флуоресцентная микроскопия, основанная на использовании флуоресцентных красителей, которые вводятся в клетки и ткани. Направленность введения красителей и контраст получаемых флуоресцентных изображений определяется их селективностью при связывании с целевыми органическими молекулами. В то же время подобные красители обладают многими недостатками: фототоксичностью, выцветанием, фоновым свечением и низким контрастом флуоресцентных изображений, возникающим из-за низкой селективности красителей к связыванию с определенными молекулами.

В данной работе продемонстрировано создание флуоресцентных центров *in situ* в ооцитах мыши с помощью цугов фемтосекундных лазерных импульсов на высокой частоте повторения. За счет использования сильной фокусировки лазерного излучения объективом микроскопа с большой апертурой и нелинейных эффектов при поглощении фемтосекундного излучения ближнего ИК диапазона биоматериалом достигается сильная локализация воздействия и минимальная инвазивность воздействия. Было продемонстрировано создание низкотоксичных и химически стабильных флуоресцентных центров в цитоплазме, ядре и ядрышке ооцитов мыши с размерами от микрона до десятков микрон. Было показано, что созданные таким методом структуры не влияют на клеточный цикл и способность ооцитов к созреванию. Когерентная антистоксовая рамановская микроскопия была использована для установления состава флуоресцентных центров и выявила наличие графитоподобных структур, которые указывают на формирование углеродных квантовых точек в биоматериале.

Работа поддержана грантами РНФ 17-73-20314, РФФИ 16-53-52046 МНТ_a.

**КИНЕТИКА СПАДА ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В ОРГАНИЧЕСКИХ
ПОЛУПРОВОДНИКАХ. ЭФФЕКТ МИГРАЦИИ ВОЗБУЖДЕНИЯ**

Анатолий Шушин

Институт химической физики им. Н. Н. Семёнова РАН, Москва, 119991, Россия;
E-mail: aishushin@mail.ru; Fax: +7(096)77-311-34

Фотоиндуцированная флуоресценция синглетных (S) возбужденных состояний (синглетных экситонов) органических полупроводников активно исследуется в течение многих лет. Столь пристальное внимание к этому фотофизическому явлению обусловлено его исключительной важностью как с фундаментальной, так и прикладной точки зрения [1]. В частности, анализ кинетики спада фотоиндуцированной флуоресценции (КСФФ) дает детальную информацию о механизмах релаксации энергии в органических полупроводниках. Традиционно в КСФФ выделяют две стадии: быструю и замедленную, наблюдаемые на малых (обычно при $t \ll 10^{-6}$ s) и больших (при $t \gg 10^{-6}$ s) временах, соответственно. Быстрая стадия определяется геминальными процессами с участием вторичных синглетных и триплетных экситонов, образующихся в процессе релаксации начального возбужденного S-состояния, а замедленная стадия – объемными процессами с участием этих (вторичных) квазичастиц.

В докладе обсуждается быстрая стадия КСФФ для низшего возбужденного S_1 -состояния. Эта стадия спада флуоресценции (из S_1 -состояния) контролируется в основном процессами спонтанного расщепления на пару триплетных (T) экситонов и их обратной аннигиляции. Предложена простая модель, позволяющая описать проявление миграции T-экситонов в кинетике ТТ-аннигиляции и, таким образом, в КСФФ S_1 -состояния. В модели эффект миграции трактуется как результат переходов между двумя состояниями ТТ-пары в пространстве: состояния взаимодействующих экситонов (на малых Т-Т расстояниях) и состояния свободно диффундирующих экситонов (на больших Т-Т расстояниях).

В рамках предложенной модели получено аналитическое выражение для быстрой стадии КСФФ $I_s(t)$. Выражение использовано для описания этой стадии кинетики, измеренной в аморфных пленках рубрена в отсутствие и при наличии магнитного поля. Подгонка параметров модели позволила с хорошей точностью воспроизвести экспериментальные КСФФ для пленок рубрена на малых временах $t \leq 10^{-7}$ s [2]. Анализ определенных таким образом КСФФ выявил существенный эффект миграции T-экситонов в $I_s(t)$, который выражается, в частности, в характерной зависимости $I_s(t) \sim t^{-3/2}$ на относительно больших временах $t \sim 10^{-7}$ s. Аналогичный анализ произведен и в применении к ряду других типов органических полупроводников (аморфных и кристаллических) [3].

В работе также обсуждаются возможные применения предложенного метода к интерпретации КСФФ, наблюдаемых в некоторых фотохимических процессах.

1. Smith M. B., Michl J., *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2013, 64, 361
2. Burdett J. J., Piland G. B., Bardeen C. J., *Chem. Phys. Lett.* 2013, 585, 1
3. Shushin A. I., *Chem. Phys. Lett.* 2017, 678, 283

Влияние конъюгации индотрикарбояниновых фотосенсибилизаторов с полиэтиленгликолем на их взаимодействия с опухолевыми клетками

Effect of conjugation indotricarbocyanine photosensitizers with polyethylene glycol to their interaction with tumor cells

Илья Яковец¹, Ирина Кравченко¹, Михаил Самцов², Владимир Зорин^{1,3}, Анатолий Луговский²

1 – Белорусский государственный университет, 220030, пр. Независимости 4, Минск, Беларусь

2 – Научно-исследовательский институт прикладных физических проблем им. А. Н. Севченко, 220045, ул. Курчатова 7, Минск, Беларусь
E-mail: samtsov@bsu.by; Tel: +375-017-212-41-44

3 – Белорусский государственный университет, МГЭИ БГУ, 220070, ул. Долгобродская 23, Минск, Беларусь

Полиметиновые красители (ПК) являются перспективными фотосенсибилизаторами (ФС) для целей фотодинамической терапии. Они обладают интенсивной полосой поглощения в области 700–800 нм, т.е. в спектральном диапазоне наибольшей «прозрачности» биологических тканей. Это позволяет значительно увеличить глубину фотоактивации молекул ФС при проведении терапии. Использование ПК в фотодинамической терапии во многом осложняется их слабой растворимостью в водных растворах. Для улучшения этого параметра синтезирован его аналог – конъюгат с двумя молекулами полиэтиленгликоля (ПКМ) [1]. Основной целью данной работы являлось сравнение процессов взаимодействия ПК и ПКМ с опухолевыми клетками K562 *in vitro* и эффективности сенсбилизированного ими повреждения этих клеток.

По результатам исследования накопления ПК и ПКМ методом проточной цитофлуориметрии установлено, что скорость и равновесный уровень накопления исследуемых красителей в клетках K562 существенно различаются. При физиологических условиях, скорость накопления ПКМ в клетках в несколько раз больше. Вследствие этого, равновесный уровень его накопления в клетках K562 в 5 раз больше. Результаты исследования сайтов преимущественной локализации ФС в клетках свидетельствуют, что ПК в цитоплазме локализуется главным образом в митохондриальных структурах, тогда как в эндоплазматическом ретикулеуме данный ФС практически не обнаруживается. Для ПКМ наблюдается диффузная прокраска всех цитоплазматических структур клеток, что свидетельствует об отсутствии преимущественной окраски каких-либо цитоплазматических структур. Изучены процессы фотодинамического повреждения клеток при окраске их ПК и ПКМ, присутствие ФС во внеклеточной среде в концентрациях вплоть до 10 мкМ для ПК и 3 мкМ для ПКМ не оказывает темнового цитотоксического эффекта. При фотовоздействии в спектральной области 750–780 нм ПКМ проявляет более высокую фотоактивность, доза излучения, необходимая для повреждения 50 % клеток в 10 раз меньше для ПКМ по сравнению с ПК.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (грант № Ф16МВ-006).

I. Lugovski A., Samtsov M., Kaplevsky K., Tarasau D., Voropay E., Petrov P., Istomin Y. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 2016, 316 (3), 31

Бесконтактное определение внутренней температуры биологических тканей по флуоресценции ап-конверсионных частиц NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺

Non-contact determination of internal temperature of biological tissue by fluorescence of NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺ up-conversional particles

Ирина Янина^{1,2}, Елена Волкова^{1,2}, Елена Сагайдачная¹, Юлия Конохова¹, Вячеслав Кочубей^{1,2}, Валерий Тучин^{1,2,3}

1 – Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского, Саратов, 410012, Россия

2 – Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, 634050, Россия

E-mail: irina-yanina@yandex.ru; Тел: +7(8452)210-716

3 – Институт Проблем Точной Механики и Управления (РАН), Саратов, 410028, Россия

Целью работы являлось сравнение различных методов определения реальной температуры биологического объекта в области нахождения ап-конверсионных частиц.

Для определения локальной температуры биологической ткани, использовались синтезированные нами термочувствительные ап-конверсионные частицы NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺, покрытые оболочкой SiO₂ (средний размер частиц 220 нм). В качестве биологического объекта использовались тонкие срезы абдоминальной жировой ткани человека *in vitro* (1.4±0.6 мкм), полученные из замороженных образцов. Для бесконтактного измерения температуры верхней поверхности образцов использовался ИК тепловизор, температура нижней поверхности регулировалась при помощи элемента Пельтье с управляющим блоком. Люминесценция частиц возбуждалась излучением полупроводникового лазера с длиной волны 980 нм и мощностью 108 мВт. Спектры люминесценции регистрировались при помощи спектрометра QE6500, Ocean Optics, США.

В экспериментах моделировалось размещение наночастиц в области приповерхностной опухоли, т.е. внутри биологической ткани. Частицы NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺ наносились на поверхность жировой ткани, затем, для воссоздания условий регистрации сигнала с глубины биоткани, образец с нанесенными наночастицами накрывался аналогичным образцом. Температура наночастиц определялась по величине натурального логарифма отношений интенсивностей люминесценции ап-конверсионных частиц NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺ на длинах волн $\lambda_1 = 551$ нм и $\lambda_2 = 520$ нм, который обратно пропорционален абсолютной температуре частиц.

Показано, что наличие фазового перехода в жировой ткани при ее нагреве (полиморфных превращений липидов) приводит к немонотонности зависимости интенсивности люминесценции для частиц, введенных в жировую ткань, вследствие изменения рассеяния света. С увеличением температуры нагрева жировая ткань становится прозрачной, что приводит к исчезновению нижней отражающей люминесценцию поверхности. Определение реальной температуры биологического объекта в области нахождения ап-конверсионных частиц осуществлялось по их спектрам люминесценции. Исследование зависимости натурального логарифма отношений интенсивностей люминесценции частиц показало различие температур нижнего слоя среза ткани, температуры между двумя срезами ткани и температуры верхнего слоя среза ткани. Температура наночастиц была выше, чем полученная для поверхности образца по данным тепловизора. Данные могут искажаться за счет рассеяния люминесценции в образце, что подтверждается лучшим совпадением результатов при температурах выше температуры фазового перехода.

СЕКЦИЯ 6. БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ И ФОТОНИКА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ, СПЕКТРАЛЬНЫЕ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПСИХРОФИЛЬНЫХ ФОТОБАКТЕРИЙ **Physiological, spectral, and energy characteristics of psychrophilic luminous bacteria**

Л. Э. Алескерова¹, М. М. Мажуль¹, А. Д. Исмаилов¹

Биологический факультет, Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова, Москва, 119234, Россия
E-mail: Leyla.07_86@mail.ru

Психрофильные штаммы светящихся бактерий наряду с люциферазой содержат флуоресцентные белки, с функциями альтернативных эмиттеров. Фотобактерии с температурным максимумом свечения при 15–17°C, и интенсивностью эмиссии *in vivo* до 10⁵ квант/с.кл. Спектры биолюминесценции сложные, с максимумом при 480 нм с плечами при 510 и 530 нм. Спектральная картина отражает суперпозицию трех различных спектров, включающих люциферазный эмиттер (490 нм), и сопутствующие флуоресцентные белки (460 и 530 нм), как участники биолюминесцентного процесса. Изучено влияние температуры на спектральные характеристики (положение максимума, базовая линия и амплитуда) отличается для светоизлучающих соединений при указанных длинах волн. Определены кинетические константы свечения в температурных зависимостях в активационном (2–20°C) и затухающем (20–30°C) диапазонах. Представлены данные по флуоресценции бесклеточного экстракта и 30–80% фракции белков этих бактерий. Анализ спектров флуоресценции показал, что наряду с белками значительный вклад в спектральную картину вносит свободный флаavin. В белковой фракции при возбуждении при 390 нм проявляется максимум около 480 нм, с выраженными плечами при 520 и 580 нм. Результаты флуоресцентного анализа подтверждают предположение, что флуоресцентные белки вместе с люциферазой вовлечены в биолюминесцентный процесс психрофильных фотобактерий. Возможно, что каждый из них имеет индивидуальную температурную зависимость.

Исследован пул АТФ в растущей культуре, покоящихся, и иммобилизованных в криогеле поливинилового спирта (ПВС) клетках психрофильных бактерий *Photobacterium phosphoreum*. Результаты работы свидетельствуют, что у данных фотобактерий на протяжении всего (более 100 ч) люминесцентного цикла глубоинной культуры пул АТФ сохраняется практически на постоянном уровне клеток. Постоянство пула АТФ наблюдается в покоящихся, и иммобилизованных клетках при инкубации их в течение более чем 200 ч в среде культивирования и более 100 часов в 3% NaCl. Проведена количественная оценка интегрального выхода фотонов и пула АТФ, на основании которой сделан вывод, что затухание свечения в растущей культуре или покоящихся клетках не является следствием лимитирования энергетическими субстратами люциферазной реакции.

ВЛИЯНИЕ ВНЕШНИХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА РАЗРЯЖЕННОГО ОБЕЛИНА

The effect of external physical and chemical factors on the spectral-luminescent properties of the discharged obelin

Роза Алиева, Надежда Кудряшева

Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук –
обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, 660036, Россия
E-mail: alieva_rosa@mail.ru

Фотопроtein обелин, выделенный из гидроидного полипа *Obelia longissima*, является уникальным, нетоксичным белком, который является селективным по отношению к ионам кальция и флуоресцирует в ходе биолюминесцентной реакции. Благодаря такому свойству этот белок и его аналоги применяются в качестве индикатора ионов внутриклеточного кальция и биолюминесцентной метки в различных аналитических системах. Вместе с тем, продукт биолюминесцентной реакции (разряженный обелин), являясь комплексом полипептида и целентерамида, способен к эффективной флуоресценции под действием возбуждающего света. Разряженный обелин также можно применять для мониторинга концентрации ионов кальция. Однако флуоресцентные свойства разряженного обелина не получили широкого распространения в биомедицинских исследованиях, и его потенциал в качестве флуоресцентного биомаркера недооценен. Данная работа направлена на расширение перспектив применения обелина, а именно, использование этого белка в качестве фотолюминесцентного биомаркера для мониторинга токсичности.

В работе проведено изучение внешних воздействий на флуоресценцию разряженного обелина ряда физико-химических факторов – экзогенных веществ (этанола, этиленгликоля, глицерина, ДМСО), повышенной температуры и процесса лиофилизации препарата. Установлено, что такие воздействия изменяют характеристики фотолюминесценции разряженного обелина в видимой области спектра. Для количественного анализа изменений интенсивности и спектрального состава все спектры были разделены на компоненты, описываемые распределением Гаусса. Было определено, что увеличение времени температурного воздействия и рост концентрации экзогенных соединений приводит к общему падению интенсивности флуоресценции разряженного обелина и изменению формы его спектров. Были рассчитаны коэффициенты тушения флуоресценции экзогенными соединениями и изменения вкладов для каждой компоненты. Вероятно, все эффекты вызваны деструктивным воздействием физико-химических факторов на разряженный обелин, в результате которых происходит уменьшение эффективности переноса протона в возбужденном состоянии целентерамида и изменение соотношения его флуоресцентных форм (протонированной и депротонированной). Использование соотношения спектральных компонент в качестве биотестового параметра может являться основой для создания нового типа биосенсора.

Исследование выполнено при поддержке краевого государственного автономного учреждения «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности» в рамках участия в «VIII Съезде российского фотобиологического общества».

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ АНАЛИЗОМ

Detection of single nucleotide polymorphisms by bioluminescent analysis

Евгения Башмакова, Василиса Красицкая, Людмила Франк

Институт биофизики СО РАН, Федеральный исследовательский центр
«Красноярский научный центр СО РАН», Академгородок, д. 50, стр. 50, Красноярск,
660036, Россия; E-mail: jeyn_a@bk.ru; Тел: +7(391)249-44-30

В лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН ведутся многолетние исследования по созданию методов высокоэффективного микроанализа на основе биоломинесцентного сигнала целентеразин-зависимых люцифераз. Целью данного исследования была разработка способа выявления однонуклеотидных полиморфизмов в гене меланокортинового рецептора первого типа (MC1R), ассоциированных с развитием меланомы кожи, и одновременного определения полиморфизмов 4-х генов (FV, MTHFR, FII, FVII), ассоциированных с риском развития нарушений системы гемостаза.

Способ основан на реакции удлинения специфического праймера (PEXT) с последующим одновременным биоломинесцентным анализом ее продуктов. Анализ проводится в микропланшетном формате и занимает около 2 ч (вместе с наработкой матрицы). Ключевыми универсальными элементами анализа являются биоломинесцентные репортеры, представляющие собой биоспецифические конъюгаты двух мутантных вариантов фотопротейна обелина, существенно различающихся по цвету и кинетике биоломинесцентных сигналов. Аллельный состав образца ДНК определяли по соотношению сигналов репортеров, свидетельствующих о наличии соответствующего аллеля. При генотипировании клинических образцов ДНК на наличие четырех полиморфизмов генов, ассоциированных с риском развития нарушений системы гемостаза, на первом этапе все матрицы получали в одной пробирке с помощью мультиплексной ПЦР. Полученную смесь без очистки использовали для четырех отдельных PEXT реакций. Результаты мультиплексного биоломинесцентного генотипирования полностью совпали с результатами раздельного генотипирования, полученными методом на основе ПЦР-РВ (n = 30).

Биоломинесцентным анализом были исследованы клинические образцы ДНК на наличие трех полиморфизмов гена MC1R, приводящих к аминокислотным заменам R151C, R160W, D294N и имеющих, по литературным данным, связь с риском развития меланомы и немеланомного рака кожи. Проанализированы 166 образцов ДНК пациентов с гистологически подтвержденным диагнозом меланомы кожи и 200 – от здоровых доноров. Для контроля нами были сконструированы плазмидные ДНК, содержащие исследуемый фрагмент ДНК с нормальными и мутантными последовательностями. Результаты анализа подтверждены прямым секвенированием.

Таким образом, разработанный нами способ выявления аллельных вариантов позволяет быстро и с высокой достоверностью проводить исследования, направленные на определение персональных генетических особенностей пациентов.

Работа поддержана грантами Российского научного фонда (SNP генов FV, MTHFR, FII, FVII – проект № 14-14-01119; SNP в гене MC1R – проект № 14-35-00107).

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ФОТОПРОТЕИН БЕРОВИН КТЕНОФОР *Beroe abyssicola*: СВОЙСТВА СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО Ca²⁺-РЕГУЛИРУЕМОГО БЕЛКА НОВОГО ТИПА

The recombinant photoprotein berovin from Ctenophore *Beroe abyssicola*:
properties of a novel type of light-sensitive Ca²⁺-regulated protein

**Людмила Буракова, Светлана Маркова, Галина Степанюк, Павел Наташин,
Наталья Маликова, Елена Еремеева, Евгений Высоцкий**

ИБФ СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, 660036, Россия
E-mail: burakoval@mail.ru; Fax: +7-3912-90-54-90

За биоломинесценцию гребневиков отвечают целентеразин-зависимые Ca²⁺-регулируемые фотопротейны, которые, в отличие от фотопротейнов гидромедуз, являются светочувствительными. С помощью функционального скрининга кДНК библиотек, полученных из тканей беломорского гребневика *B. abyssicola*, изолировано 4 гена фотопротейна, кодирующих один и тот же полипептид из 208 аминокислот с молекулярной массой 24,9 кДа. Хотя беровин, как и фотопротейны гидромедуз, содержит 3 Ca²⁺-связывающих сайта EF-hand типа, выполняет идентичные функции и имеет схожую пространственную архитектуру, степень идентичности их аминокислотных последовательностей составляет не более ~25%.

Рекомбинантный апо-беровин можно преобразовать в активный фотопротейн, максимальный выход которого наблюдается при инкубации *in vitro* с целентеразином в присутствии O₂ в бескальциевых условиях при щелочном pH в темноте при высокой ионной силе без добавления восстанавливающих агентов. В нейтральных условиях апо-беровин катализирует биоломинесцентное окисление целентеразина без участия кальция. Активный беровин в видимой области спектра имеет максимум поглощения при 437 нм, в отличие от фотопротейнов гидромедуз (I_{max}=460 нм). При облучении светом видимого диапазона беровин теряет практически всю биоломинесцентную активность, после чего исчезает поглощение в видимой области спектра. Фотоинактивированный беровин может быть снова преобразован в активный фотопротейн при инкубации с целентеразином.

Структура апо-беровина с ионами магния и влияние Mg²⁺ на чувствительность к Ca²⁺ показывают, что все Ca²⁺-связывающие петли беровина относятся к смешанному Ca²⁺/Mg²⁺ типу, но с более высокой аффинностью к Ca²⁺, чем к Mg²⁺.

Согласно пространственной модели беровина с 2-гидропероксицелентеразином были определены аминокислоты, предположительно формирующие его внутреннюю полость. Получен и исследован 21 мутант с единичными заменами этих аминокислот. Высказано предположение, что пероксианион целентеразина стабилизируется за счет кулоновского взаимодействия с положительно заряженной гуанидиновой группой Arg41 в паре с Tyr204 (рис. 1).

Работа поддержана грантом РФФИ 17-04-00764-а.

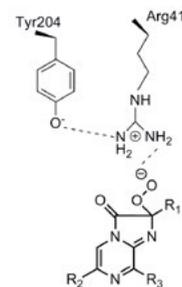


Рис. 1. Предполагаемое взаимодействие зарядов в беровине, стабилизирующее 2-пероксианион целентеразина.

**КАЛЬЦИЙ⁺-РЕГУЛИРУЕМЫЕ ФОТОПРОТЕИНЫ
МОРСКИХ СВЕЯЩИХСЯ ОРГАНИЗМОВ**
Calcium-regulated photoproteins of marine luminous organisms

**Евгений Высоцкий, Светлана Маркова, Людмила Буракова,
Елена Еремеева, Павел Наташин, Наталья Маликова**

ИБФ СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, 660036, Россия
E-mail: eugene.vysotski@gmail.com; Fax: +7(391)290-54-90

Явление биолуминесценции широко распространено среди морских организмов. Многие из них генерируют свет, используя в качестве субстрата целентеразин. Целентеразин-зависимые биолуминесцентные системы можно разделить на два типа. К одному из них относятся системы, в которых люцифераза – типичный фермент, катализирует окислительное декарбоксилирование целентеразина с образованием продукта, целентерамида, в возбужденном состоянии [1]. К другому типу относятся Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины, ответственные за свечение морских гидромедуз и ктенофор. Фотопротеины – уникальный класс биолуминесцентных белков. По сути, Ca^{2+} -регулируемый фотопротеин представляет собой стабильный фермент-субстратный комплекс, состоящий из апобелка и прочно, но нековалентно связанного с ним активированного кислородом 2-гидропероксицелентеразина [2]. Связывание ионов кальция с белком инициирует заключительную стадию биолуминесцентной реакции – декарбоксилирование 2-гидропероксипроизводного целентеразина, приводящее к образованию связанного с белком целентерамида в возбужденном состоянии, переход которого в основное состояние сопровождается излучением света с λ_{max} при 460–495 нм [3]. Интерес к Ca^{2+} -регулируемым фотопротеинам обусловлен не только желанием понять механизм функционирования этих уникальных белков. Главным фактором все-таки является их аналитический потенциал. В настоящее время фотопротеины широко используются в качестве индикаторов $[\text{Ca}^{2+}]_i$, позволяющих отслеживать динамику этого универсального мессенджера как в цитоплазме клеток, так и в их отдельных органеллах.

За последние 20 лет клонированы кДНК генов, кодирующих фотопротеины из нескольких светящихся организмов, и определены пространственные структуры фотопротеинов в различных лиганд-зависимых конформационных состояниях. Все фотопротеины оказались односубъединичными глобулярными белками, содержащими три Ca^{2+} -связывающий сайта «EF-hand» типа. Это позволило не только предложить механизм биолуминесцентной реакции и функцию отдельных аминокислот активного центра в излучении света, но и сконструировать мутанты с измененными свойствами. В данной работе представлен обзор последних успехов в области исследований Ca^{2+} -регулируемых фотопротеинов из различных организмов.

Исследования поддержаны грантом РФФИ № 17-04-00764 и совместным грантом РФФИ и Правительства Красноярского края №16-44-242099.

1. Маркова С. В., Высоцкий Е. С., *Биохимия*, 2015, 80 (6), 845
2. Shimomura O., *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*, World Scientific Publishing, Singapore, 2006
3. Vysotski E. S., Lee J., *Acc. Chem. Res.*, 2004, 37 (6), 405

**ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БИОЛУМИНЕСЦЕНТНОГО
ТЕСТИРОВАНИЯ СЛЮНЫ В ОЦЕНКЕ ВЛИЯНИЯ
ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ
СОСТОЯНИЕ ОРГАНИЗМА СПОРТСМЕНОВ**
Possibilities of using bioluminescent test of saliva in the evaluation of the influence
of the physical load on the functional state of the athletes' organism

**Александра Вышедко^{1*}, Людмила Степанова¹, Оксана Коленчукова²,
Ольга Колесник¹, Галина Жукова¹, Валентина Кратасюк^{1,3}**

- 1 – Сибирский федеральный университет, пр. Свободный 79, Красноярск, 660041, Россия
 - 2 – НИИ медицинских проблем Севера, Красноярск, 660022, Россия
 - 3 – ИБФ СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Академгородок, Красноярск, 660036, Россия
- * E-mail: sever_sasha@list.ru; Tel: +7(923)271-60-94

Влияние нагрузки на организм спортсмена выявляют при помощи комплекса функциональных проб [1]. Экспрессное лабораторное диагностирование влияния физической нагрузки на организм можно проводить по слюне с использованием биолуминесцентного метода [2]. Поэтому целью исследования явилось оценка принципиальной возможности применения биолуминесцентного метода для определения уровня физической нагрузки, получаемой организмом спортсмена.

Тестирование слюны спортсменов (n=14) со спортивными разрядами ЗМС, МС, КМС, 1 разряд проводили в течение 5 дней (с ежедневной возрастающей нагрузкой) до и после тренировок биолуминесцентным методом на основе биферментной системы НАДН:ФМ–оксидоредуктаза+люцифераза и методом H_2O_2 -люминол-зависимой хемилуминесценции. Свечение регистрировали на планшетном люминометре (Berthold Technologies, Германия). Тренировочный эффект выявляли по изменению остаточного свечения до и после тренировок. Функциональное состояние организма спортсменов оценивали по показателям ортостатической пробы и ЧСС (частота сердечных сокращений) за минуту.

Значения ортостатической пробы спортсменов при всех тренировках были выше уровня восстановления. При этом, видимо, спортсмены были в фазе недо-восстановления и не достигали фазы суперкомпенсации. Выявлено достоверное ежедневное возрастание остаточного свечения с увеличением физической нагрузки и резкое возрастание ингибирования после дня отдыха. Изменение остаточного свечения достоверно коррелировало с повышением ЧСС после физических нагрузок и возрастающей интенсивностью работы антиоксидантной системы слюны.

Таким образом, биолуминесцентное тестирование слюны хорошо коррелирует с показателями функциональными состояния организма, но имеет преимущество перед стандартными тестами по неинвазивности, простоте и возможности многократного проведения тестирования во время тренировок и на соревнованиях.

Работа поддержана КГАУ «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности» (КФ-537) и РФФИ (16-06-00439).

1. Матвеев Л. П. *Москва: Физкультура и спорт*, 1991, 543
2. Kratasyuk V., Esimbekova E. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2015, 18 (10), 952

**ОПТИМИЗАЦИЯ СВОЙСТВ ЛЮЦИФЕРАЗЫ
Metridia longa КАК БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО
РЕПОРТЕРА МЕТОДОМ СЛУЧАЙНОГО МУТАГЕНЕЗА
Optimization of the properties of *Metridia longa* luciferase as a bioluminescent
reporter by random mutagenesis**

**Дарья Горбунова^{1,2}, Светлана Маркова^{1,2}, Марина Ларионова^{1,2},
Евгений Высоцкий¹**

1 – ИБФ СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, 660036, Россия
2 – Сибирский федеральный университет, Красноярск, 660041, Россия
E-mail: gorbunova_dacha@mail.ru

Люцифераза из морских копепод *Metridia longa* – небольшой секретлируемый белок, катализирующий реакцию окисления целентеразина с излучением голубого света ($\lambda=485$ нм) [1]. Перспективность применения люциферазы *M. longa* в качестве биоломинесцентного репортера была успешно продемонстрирована как в *in vitro* анализе [2], так и *in vivo* [3]. Преимуществами использования данной люциферазы являются высокая активность и стабильность, простота катализируемой реакции и малый размер белка. Однако температурный оптимум реакции даже у самой «теплолюбивой» изоформы MLuc164 люциферазы *M. longa* находится в диапазоне ~15–20°C. Кроме того, эмиссия в голубой области спектра, интенсивно поглощаемая живыми клетками, препятствует успешному использованию такого репортера в тканях и лабораторных животных.

Целью данного исследования было получение улучшенных мутантных вариантов люциферазы MLuc164 для использования в качестве биоломинесцентного репортера. Поскольку пространственная структура люциферазы *M. longa* не известна, для получения желаемых мутантных форм был использован метод случайного мутагенеза. Библиотека мутантов была получена при использовании конструкции для экспрессии MLuc164 в виде гибридного белка с YebF, потенциально способного к секреции из *E. coli*. Такой подход позволил обеспечить транспорт гибридного белка YebF-MLuc164 в бактериальную периплазму, где возможно эффективное созревание люциферазы, и провести скрининг мутантов прямо на колониях.

В результате проведенной селекции были обнаружены мутанты люциферазы со значительным сдвигом температурного оптимума биоломинесценции в сторону 37°C. Один из таких мутантов *mluc164-M77I* был успешно использован в качестве биоломинесцентного репортера, стабильно экспрессируемого постоянной клеточной линией меланомы человека. Кроме того, был обнаружен ряд мутаций, приводящих к небольшому сдвигу эмиссионного спектра в длинноволновую область.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Красноярского края в рамках научного проекта №16-44-242099.

1. Маркова С. В., Высоцкий Е. С., *Биохимия*, 2015, Т.80 (6), 845
2. Borisova V. V., Frank L. A., Markova S. V., Burakova L. P., Vysotski E. S., *Photochem Photobiol. Sci.*, 2008, 7, 1025
3. Markova S. V., Larionova M. D., Burakova L. P., Vysotski E. S., *BBRC*, 2015, 457, 77

**МОДЕЛИРОВАНИЕ БЫСТРОЙ КИНЕТИКИ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ
Ca²⁺-РЕГУЛИРУЕМЫХ ФОТОПРОТЕИНОВ
Fast kinetics modeling of Ca²⁺-regulated photoprotein bioluminescence**

Елена Еремеева, Сергей Барцев, Евгений Высоцкий

ИБФ СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, 660036, Россия
E-mail: l_eremeeva@mail.ru; Fax: +7-391-243-3400

Биоломинесцентные системы, в которых в качестве субстрата используется целентеразин, широко распространены в природе, в особенности в морской среде. Биоломинесценция многих морских организмов обусловлена присутствием Ca²⁺-регулируемых фотопротеинов – представителей семейства «EF-hand» Ca²⁺-связывающих белков. Ca²⁺-регулируемые фотопротеины представляют собой стабильный фермент-субстратный комплекс, состоящий из апофотопротеина (~22 kDa) и молекулы органического субстрата – 2-гидропероксицелентеразина [1]. При связывании ионов кальция фотопротеины претерпевают конформационные изменения, запускающие реакцию окислительного декарбоксирования 2-гидропероксицелентеразина, в результате которой образуется целентерамид в возбужденном состоянии и CO₂ [2]. Переход целентерамида из возбужденного состояния в основное сопровождается излучением кванта света.

В данной работе были исследованы кинетические параметры биоломинесцентной реакции ряда Ca²⁺-регулируемых фотопротеинов методом остановленной струи. Пять фотопротеинов – акворин из *Aequorea victoria*, клитин из *Clytia gregaria*, митрокомин из *Mitrocoma cellularia* и обелины из *Obelia longissima* и *Obelia geniculata* – продемонстрировали одинаковый профиль кинетической кривой. После быстрого смешивания с кальцием наблюдалось резкое увеличение биоломинесцентного сигнала, максимум которого достигался в течение миллисекунд. Затем следовал медленный спад биоломинесценции, длящийся секунды. Однако константы скорости подъема и спада биоломинесцентной реакции существенно различались среди представленных фотопротеинов. На основании полученных данных была предложена кинетическая схема биоломинесцентной реакции фотопротеинов, учитывающая явление положительной кооперативности связывания ионов кальция. Данная модель является универсальной для семейства Ca²⁺-регулируемых фотопротеинов, так как с высокой степенью точности описывает кинетические кривые всех исследованных фотопротеинов при насыщающих концентрациях кальция.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (гранты 14-04-31092 и 17-04-00764), тем государственного задания №0356-2016-0712, №0356-2015-0103 и № АААА-А17-117013050027-1, а также краевого государственного автономного учреждения «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности» в рамках участия в мероприятии VIII Съезд российского фотобиологического общества.

1. Shimomura O., Johnson F. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, 75 (6), 2611
2. Vysotski E. S., Lee J., *Acc. Chem. Res.*, 2004, 37 (6), 405

**ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СПОСОБЫ ДИАГНОСТИКИ
НЕФРОПАТИЙ У НОВОРОЖДЕННЫХ**
Luminescent methods of diagnostics of newborn's nephropates

**Галина Зубрицкая¹, Анна Кутько¹, Алла Перковская²,
Екатерина Слобожанина¹**

1 – ГНУ "Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси", г. Минск,
220072 Республика Беларусь

E-mail: petro371@mail.ru; Fax: +8-10-375-17-284-23-59

2 – Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, РБ

В настоящее время возросло внимание исследователей к проблеме почечной патологии у новорожденных. Частота нефропатий неонатального периода, по данным различных авторов, колеблется от 23 до 95%, что связано с ухудшением экологического фона, увеличением перинатальной патологии и заболеваемости матерей, расширением реанимационной помощи новорожденным и внедрением современных методов диагностики. Одним из вспомогательных методов диагностики патологий является люминесцентный способ исследования. Целью нашего исследования явилась разработка быстрого, простого в исполнении люминесцентного способа диагностики почечной патологии у новорожденных.

В работе использована моча новорожденных, страдающих перинатальными нефропатиями (n=30) на стадии предболезни. Обследованные новорожденные находились в ГУ РНПЦ «Мать и дитя» МЗ РБ. В качестве контроля собиралась моча практически здоровых новорожденных (n=20), находящихся в данном учреждении.

Способ заключается в следующем: удаляют нерастворимый материал из мочи путем центрифугирования образца, затем проводят спектрофлуориметрию его при возбуждении светом длиной волны в области 375±10 нм и регистрируют спектр собственной люминесценции в области длин волн 420–650 нм. При наличии спектра люминесценции с максимумом в области 520–540 нм диагностируют нефропатию новорожденных (Патент РБ N 17616 «Способ доклинической диагностики нефропатии у новорожденных»). Нами установлено, что моча здоровых новорожденных при возбуждении светом такой же длиной волны имеет спектр люминесценции с максимумом в области 440–460 нм. Появление максимума в области 520–540 нм в спектре собственной люминесценции мочи новорожденного с нефропатией можно скорее всего объяснить повышенным содержанием уровня уробилина или биливердина в моче или, возможно, наличием связанного с белками билирубина при данной патологии. Преимущество люминесцентного способа диагностики над другими заключается в том, что для исследования нужно небольшое количество мочи (1–2 мл), что дает возможность использовать метод для диагностики недоношенных новорожденных с низкой массой тела. Данный способ можно применять на любой стадии заболевания и предболезни, а также при наличии сопутствующих заболеваний.

Таким образом, по спектрально-флуоресцентным параметрам собственной люминесценции мочи можно судить о наличии перинатальных нефропатий у новорожденных, в том числе и у недоношенных. Этот метод рекомендуется использовать для доклинического выявления перинатальных нефропатий, проведения диспансерного наблюдения за новорожденными детьми, а также для наблюдения за эффективностью проводимого лечения.

СВЕЯЩИЕСЯ БАКТЕРИИ АРКТИЧЕСКИХ МОРЕЙ
Luminous bacteria of the Arctic seas

Анвар Исмаилов

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

E-mail: anvaris@list.ru

Арктические моря, как среда обитания фотобактерий, практически не изучены. Исходя из имеющихся данных по контролю физиологических и эмиссионных параметров у разных видов фотобактерий температурным фактором среды обитания, можно было ожидать проявления штаммов с высокоэффективной и длительной генерацией света именно в акваториях с низкой среднегодовой температурой. Из внутренних органов рыб (бычок, треска, навага, камбала) Белого и Берингова морей выделены фотобактерии. Установлено, что независимо от объекта-хозяина и органа выделения все обнаруженные фотобактерии относятся к психрофильному виду *Photobacterium phosphoreum*. Фотобактерии, кроме морфологических и физиологических отличий, характеризуются и высокосопряженной люминесцентной электронтранспортной системой. Удельная активность психрофильных *P. phosphoreum*, – до 10⁵ фотонов на клетку. Длительность свечения в глубоководной культуре (люминесцентный цикл) при 17°C свыше 7 суток. Спектр биоломинесценции клеток характеризуется относительно широким максимумом при 476–480 нм и плечами при ~510 нм и ~540 нм. Спектральная картина соответствует доминирующему функционированию у бактерий в относительно низких температурных условиях двух: люциферазного (Lux) и люмазинового (LP) излучателей света. При этом эффективность генерации фотонов этими эмиттерами у данного вида бактерий соизмерима, что определяет перекрывающуюся спектральную картину в области максимума. Плечо при 540 нм. указывает на возможное присутствие и т.н. YFP – белка, обычно характерного для бактерий *Vibrio fischeri* Y-1. Анализ спектров флуоресценции 30–80% белковой фракции *P. phosphoreum* показал, что при возбуждении при 390 нм проявляется максимум около 480 нм, с выраженными плечами при 520 и 580 нм. Предполагается, что перенос энергии на люмазиновый эмиттер может происходить не с люциферазного интермедиата, а непосредственно с НАДН:ФМН-оксидоредуктазы.

**ОЦЕНКА КАЧЕСТВА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ПРОДУКТОВ
ПИТАНИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ**
Evaluation of quality of agricultural food products by bioluminescent method

В. П. Калябина¹, Е. Н. Есимбекова^{1,2}, И. Г. Торгашина¹, В. А. Кратасюк^{1,2}

1 – Сибирский федеральный университет, Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79
2 – Институт биофизики СО РАН, Федеральный исследовательский центр
«Красноярский научный центр СО РАН», Красноярск, 660036, Россия
E-mail: valeriyaakalyabina@mail.ru; тел: +7(913)183-44-08

Значительная часть сельскохозяйственной продукции, реализуемой в настоящее время, загрязнена токсичными соединениями, часть из которых запрещена в России. Согласно современной схеме контроля, проводится компонентный анализ лишь небольшого ряда токсикантов в продуктах питания импортного и местного производства. Актуальной задачей является создание методик комплексной оценки качества пищевой продукции.

Целью работы является разработка экспресс-метода оценки качества сельскохозяйственных продуктов питания с помощью биоломинесцентных ферментативных систем. В основе метода лежит обнаружение токсических свойств анализируемых веществ по их влиянию на ферментативные реакции.

В работе были проведены модельные эксперименты оценки ингибирующего воздействия токсикантов на параметры биоломинесценции биферментной системы светящихся бактерий: NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза (P+Л). Степень воздействия металлов на активность системы P+Л оценивали по величине параметров IC_{20} и IC_{50} , представляющих собой концентрации металлов, вызывающие снижение активности системы на 20 и 50% соответственно. Было показано, что ферментативная система светящихся бактерий является чувствительной к ряду металлов на уровне и ниже уровня ПДК, таких как свинец, цинк, медь, ртуть, алюминий и хром. Наибольшее ингибирующее воздействие на активность биферментной системы оказывает медь. Также было исследовано влияние пестицидов, растворимых при нормальных условиях в спирте. Было выяснено, что ферментативная система светящихся бактерий является чувствительной к α - и γ -изомерам гексахлорциклогексана, 4,4-ДДЭ и 4,4-ДДТ на уровне и ниже уровня МДУ.

Была разработана лабораторная методика пробоподготовки образцов, совместимая с ферментативной системой светящихся бактерий, и предложена схема проведения биоломинесцентного анализа. Показано, что оптимальные параметры пробоподготовки образца составляют 5 минут центрифугирования при скорости 10000g и температуре 25°C. Исследование зависимости от времени и условий хранения показало, что экстракты образцов, подготовленные для анализа, можно хранить при комнатной температуре около часа и в течение суток при 4°C без значительной потери активности.

Данный способ является перспективным для оценки загрязненности сельскохозяйственных продуктов питания токсическими соединениями.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Красноярского края Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности (проект № 16-44-242126).

**ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ И АДАПТАЦИОННЫХ ЭФФЕКТОВ
С ПОМОЩЬЮ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ТЕСТОВЫХ СИСТЕМ
РАЗЛИЧНОЙ СЛОЖНОСТИ: БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК,
ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ**
**Toxic and adaptive effects via luminescent assay systems of different complexity:
from bacterial cells through enzyme reactions to fluorescent proteins**

**N. S. Kudryasheva^{1,2}, R. R. Alieva¹, T. V. Rozhko^{3,2}, A. S. Petrova⁴,
A. A. Lukonina², E. S. Kovel², A. S. Sachkova⁵**

1 – Institute of Biophysics SB RAS, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”, Akademgorodok 50/50, Krasnoyarsk, 660036, Russia
E-mail: n-qdr@yahoo.com, tel:+7(391)294242
2 – Siberian Federal University, Svobodny Prospect 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia
3 – Krasnoyarsk State Medical Academy, Krasnoyarsk, 660022, Russia
4 – Krasnoyarsk State Agrarian University, 90 Mira Prospect, Krasnoyarsk, 660049, Russia
5 – National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, 634050, Russia

Luminescence of living systems is a convenient parameter to monitor environmental toxicity. Luminescent systems of different complexity – luminous marine bacteria, their enzyme reactions, and coelenteramide-containing fluorescent proteins (CLM-CFPs) were used as bioassays to monitor toxicity of water solutions under model conditions; toxic effects were compared at cellular, biochemical and protein levels, respectively. Organic compounds, metallic salts, and radioactive elements (under conditions of low-dose irradiation) were applied to vary toxicity of media. Luminescence inhibition (toxic) and activation (adaptive response) effects were evaluated and discussed. Application of CLM-CFPs as toxicity bioassays of a new type is justified, they can serve as a proper tool for study efficiency of primary physicochemical processes in organisms under external exposures. Coelenteramide (CLM), fluorophore of CLM-CFPs, is a photochemically active molecule; it acts as a proton donor in its electron-excited states, generating several forms of different fluorescent state energy and, hence, different fluorescence color, from violet to green. Contributions of the forms to the visible fluorescence depend on the CLM microenvironment in proteins. Hence, CLM-CFPs can serve as fluorescence biomarkers with color differentiation to monitor results of destructive biomolecule exposures. Variations of spectral-luminescent and photochemical properties of CLM-CFPs under different exposures – chemicals, temperature [1], and ionizing radiation [2] is considered.

Application of the luminescent bioassays of different complexity for detoxification efficiency evaluation is discussed. Natural and artificial bioactive compounds, humic substances [3] and fullereneols [4–5], are used as detoxifying agents. Detoxification mechanisms were revealed to be complex, with chemical, biochemical, and cellular aspects conditioning those. Active role of the bioassay systems in the detoxification processes was demonstrated.

1. Alieva R., Kudryasheva N. *Talanta*, 2017, 170, 425
2. Petrova A., et al. *Anal&Bioanal. Chem.* 2017. DOI: 10.1007/s00216-017-0404-9
3. Kudryasheva N., Tarasova A. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2015, 22 (1), 155
4. Kudryasheva N., et al. *Photochemistry and Photobiology*. 2017, 93(2), 536
5. Sachkova A., et al. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2017, 9, 1–8

АКТИВИРУЕМАЯ ХОЛОДОМ ЛЮЦИФЕРАЗА ИЗ *Metridia longa*: ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ

ОСОБЕННОСТЕЙ ЭКСТРЕМОФИЛЬНОГО БЕЛКА

Cold-active luciferase from *Metridia longa*: structural study of the extremophilic protein

Марина Ларионова^{1,2}, Светлана Маркова^{1,2}, Евгений Высоцкий^{1,2}

1 – Институт биофизики СО РАН, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», г. Красноярск, 660036, Россия

2 – Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, Сибирский Федеральный Университет, г. Красноярск, 660041, Россия

E-mail: lariova.marina@inbox.ru

Биоломинесценция морских копепод обусловлена наличием люцифераз, осуществляющих окисление субстрата целентеразина с испусканием голубого света ($\lambda=485$ нм). В настоящее время копеподные люциферазы – перспективные репортерные молекулы благодаря естественной секреции, небольшой молекулярной массе, высокой ферментативной активности, а также широкому диапазону детекции [1]. При скрининге кДНК-библиотеки из морской копеподы *Metridia longa*, было идентифицировано 3 изоформы люциферазы, существенно отличающихся по последовательностям и свойствам. В данной работе описана новая изоформа MLuc2 (18.5 кДа), являющаяся экстремально психрофильным ферментом. Гомология аминокислотной последовательности MLuc2 с ранее клонированными составляет ~54–64%.

При помощи бакуловирусной системы экспрессии удалось обеспечить высокий уровень продукции люциферазы MLuc2 с нативной структурой и подобрать оптимальные условия очистки с выходом свыше 6 мг/л. Показано, что новая изоформа демонстрирует максимальную активность при температуре около 5°C, а также проявляет чрезвычайную термостабильность, несвойственную психрофильным белкам.

Известно, что белки, обладающие низким оптимумом по сравнению с родственными, характеризуются большей конформационной мобильностью структуры за счет ослабления внутримолекулярных взаимодействий [2]. Экспериментально было показано, что изоформа MLuc2 имеет 2 свободных тиольных группы, свидетельствующих об отсутствии одной S-S-связи. Структурные различия были также подтверждены спектральными исследованиями тушения собственной триптофановой флуоресценции. Для MLuc2 были характерны более низкие значения температуры плавления (T_m) во время тепловых переходов.

Предполагается, что новая психрофильная люцифераза MLuc2, расширяющая спектр возможных биоломинесцентных репортерных белков, может служить эффективным инструментом для исследования холодолюбивых организмов, а также быть применена для изучения психрофильных белков.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Красноярского края в рамках научного проекта №16-44-242099.

1. M. D. Larionova, S. V. Markova, E. S. Vysotski, *BBRC*, 2017, 483 (1), 772

2. Struvay C., Feller G., *Int J Mol Sci.*, 2012, 13 (9), 11643

АТФ КАК ИНДИКАТОР МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ATP as indicator of metabolic activity of living microorganisms

Галина Ломакина, Наталья Угарова

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119992, Россия

E-mail: lomakinagalina@yahoo.com; факс: +7(495) 939-26-60

Аденозинтрифосфат (9-β-D-рибофуранозиладенин-5)-трифосфат, или 9-β-D-рибо-фуранозил-6-амино-пурин-5)-трифосфат) – нуклеотид, трифосфорный эфир аденозина, который является производным аденина и рибозы, (АТФ), служит универсальным источником химической энергии для функционирования живых существ (млекопитающих, микроорганизмов, растений и т. д.). Энергетическое обеспечение метаболических процессов, происходящих в клетке, а именно: передача энергии и ее восполнение, осуществляется за счет обратимого взаимоперехода АТФ↔АДФ↔АМФ. Таким образом, равновесная концентрация внутриклеточного АТФ отражает функционально-метаболическое состояние живых клеток. Например, содержание АТФ в живой клетке на стационарной фазе роста постоянно и достаточно высоко – 10^{-19} до 10^{-15} моль АТФ и зависит от типа микроорганизма.

Безальтернативный селективный и чувствительный метод определения АТФ, который может быть использован для решения многих научных задач, метод биоломинесцентной АТФ-метрии, позволяющий измерять концентрации АТФ в образце ниже, чем 10^{-12} М практически в режиме реального времени, основан на люциферин-люциферазной реакции. Достоинства метода – короткое время анализа, простота, хорошая воспроизводимость, широкий линейный диапазон определяемых концентраций. Измеряя концентрацию внутриклеточного АТФ, можно оценить содержание живых клеток в образце. Метод незаменим для оценки жизнеспособности и некультивируемых, и медленно растущих микроорганизмов, изучения механизма функционирования клеточных агрегатов и биопленок. При этом анализ биологических жидкостей на содержание АТФ может быть осуществлен без предварительной обработки материала – мутность среды и окрашенность практически не мешают анализу.

На любые стрессовые воздействия химической, физической и биологической природы клетка отвечает изменением содержания внутриклеточного АТФ, которое может быть зафиксировано инструментально. Анализ кинетики изменения уровня внутриклеточного АТФ, а также отношения содержания АТФ/АДФ, позволяет изучать различные патологии клетки, например, механизмы клеточной гибели – некроза и апоптоза. Метод удобен для оценки цитотоксичности различных агентов, в том числе для скрининга лекарственных препаратов. По соотношению внутриклеточного и внеклеточного АТФ можно оценить степень изменения энергетического статуса клетки при оказании на нее внешних воздействий, дифференцировать живые и разрушенные клетки, например, при замораживании, в процессе лиофилизации и других технологических процессах.

Таким образом, биоломинесцентный метод определения АТФ является мощным инструментом для изучения механизма функционирования клеток.

ИЗОФОРМЫ ЛЮЦИФЕРАЗЫ *Metridia longa*: ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ РЕПОРТЕРОВ *IN VIVO* И *IN VITRO*
Isoforms of *Metridia longa* luciferase: properties and prospects for application as bioluminescent reporters *in vivo* and *in vitro*

Светлана Маркова^{1,2}, Марина Ларионова^{1,2}, Евгений Высоцкий^{1,2}

1 – ИБФ СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, 660036, Россия

2 – Сибирский Федеральный Университет, Красноярск, 660041, Россия

E-mail: svetlana@ibp.ru

Ярко светящаяся голубая капля, выстреливаемая при опасности морскими копеподами *Metridia longa*, отвлекает хищников и прикрывает бегство рачков. Это свечение обусловлено небольшой секретируемой люциферазой, окисляющей субстрат целентеразин с испусканием света $\lambda_{\text{max}}=480$ нм. При использовании функционального скрининга было идентифицировано четыре группы неаллельных изоформ люциферазы, отличающихся некоторыми свойствами. Также изоформы существенно различаются размерами от 18.4 kDa до 23.9 kDa и степенью сходства белковых последовательностей от 53% до 80% идентичности между группами [1, 2].

Здесь мы сообщаем о физико-химических свойствах изоформ различных типов люциферазы *M. longa* и о перспективах применения различных изоформ в качестве биоломинесцентных репортеров в биомедицинских исследованиях, включая биоимиджинг *in vivo*. Все исследования свойств выполнены на чистых рекомбинантных белках. Изоформы люциферазы *M. longa* содержат высококонсервативный участок с 10 цистеиновыми остатками, что предполагает наличие 5 дисульфидных внутримолекулярных связей, поскольку свободные Cys-остатки не детектируются. Проблема получения функционально активных дисульфид-богатых рекомбинантных люцифераз с нативной структурой была решена посредством секретируемой экспрессии в клетках насекомых.

Все исследованные изоформы люцифераз *M. longa* демонстрировали высокую биоломинесцентную активность и экстремальную термостабильность. Чувствительность детекции люцифераз достигала ~1 fM с линейным характером зависимости в диапазоне до 7 порядков, что указывает на их отличные репортерные свойства [1–3]. Основные различия между типами люцифераз *M. longa* найдены в кинетике, требовательности к концентрации солей, а также в температурных оптимумах биоломинесцентной реакции, которые представлены в диапазоне от ~4°C до 20°C [2]. Предполагается, что наличие люциферазных изоформ с различными свойствами позволяет сделать наилучший выбор биоломинесцентного репортера в зависимости от конкретных экспериментальных задач [3].

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Красноярского края в рамках научного проекта №16-44-242099.

1. Markova S. V., Larionova M. D., Burakova L. P., Vysotski E. S., *BBRC*, 2015, 457, 77

2. Larionova M. D., Markova S. V., Vysotski E. S., *BBRC*, 2017, 483 (1): 772

3. Маркова С. В., Маликова Н. П., Высоцкий Е. С., Франк Л. А. Гительзон И. И.

Биофизика, 2017, 62 (3), 618

НЕСТАЦИОНАРНАЯ КИНЕТИКА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ РЕАКЦИИ БАКТЕРИЙ: ПОИСК ЛИМИТИРУЮЩИХ СТАДИЙ В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОЙ ВЯЗКОСТИ
Non-stationary kinetics of the bacterial bioluminescent reaction: elucidation of rate-limiting steps in viscous media

Елена Немцева^{1,2}, Альберт Лисица¹, Юлия Прокопишко¹, Сергей Барцев², Валентина Кратасюк^{1,2}

1 – Сибирский федеральный университет, Красноярск, 660041, Россия

2 – Институт биофизики СО РАН, Федеральный исследовательский центр

«Красноярский научный центр СО РАН», Красноярск, 660036, Россия

E-mail: enemtseva@sfu-kras.ru; Fax: +7(391)206-21-65

Работа направлена на изучение особенностей функционирования ферментов во внутриклеточном окружении, отличающемся от традиционных буферных растворов, в частности, повышенной вязкостью. Среда с добавлением низкомолекулярных (глицерин, сахароза) и высокомолекулярных (полиэтиленгликоль, фиколл и др.) вязкогенов могут моделировать условия протекания биохимических процессов *in vivo*.

Были использованы: фермент люцифераза из *Photobacterium leiognathi* (ИБФ СО РАН, Красноярск), субстраты: миристиновый альдегид (MP biomedical) и флавиномононуклеотид (Sigma), вязкие агенты: глицерин, сахароза (Panreac), фиколл (Sigma-Aldrich) и полиэтиленгликоль (Panreac). Восстановление флавиномононуклеотида проводили фотохимически в присутствии этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA, Roth). Кинетику ферментативной реакции регистрировали по интенсивности биоломинесценции методом остановленного потока с помощью анализатора SX-20 (Applied Photophysics). Вязкость среды варьировали в диапазоне 1–10 сП. Математическое моделирование кинетических кривых проводили в MS Excel и SciLab.

Была изучена нестационарная кинетика биоломинесцентной реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, в вязких средах различного состава. Получено, что для описания регистрируемых кинетических кривых биоломинесценции требуется модель, предполагающая не менее шести стадий реакции. Установлено, что начальная стадия процесса (до достижения максимальной интенсивности) хорошо описывается экспоненциальной функцией, т.е. лимитируется скоростью одной стадии реакции, предположительно – связывания альдегида в активном центре люциферазы. При этом спад интенсивности в буфере происходит по биэкспоненциальному закону, в то время как в вязких средах этот участок кинетической кривой хорошо описывается моноэкспоненциальной функцией. Таким образом, сделан вывод, что образование электронно-возбужденного интермедиата реакции происходит в буфере по двум параллельным путям. При повышении вязкости среды остаётся только один путь образования кванта света в реакции, катализируемой бактериальной люциферазой. Предложены схемы биоломинесцентной реакции, объясняющие наблюдаемые особенности кинетики.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект №16-14-10115) и Министерства образования и науки РФ (государственное задание на выполнение работ, проект №6.7734.2017/БЧ).

**БИОФОТОНЫ (ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ): ИССЛЕДОВАНИЯ
НА СИСТЕМЕ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ
Biophotons (luminescence): Studies in the whole blood system**

**Кирилл Новиков¹, Владимир Воейков¹, Екатерина Буравлева¹,
Ольга Яблонская², Надежда Бердникова³, Алексей Новиков³**

1 – Биологический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, 119234, Москва, Россия
2 – Институт Биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, Россия
3 – Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, 119991, Москва, Россия
E-mail: kirknikov@yandex.ru; Тел.: +7(905)586 40-47

Мониторинг спонтанной и усиленной люминофорами эмиссии фотонов (ЭФ) из цельной неразведенной крови человека при нормальных условиях и искусственно вызванной иммунной реакции показывает, что кровь является непрерывным источником люминесценции (биофотонов), указывающим, что она находится в электронно-возбужденном состоянии [1]. Это состояние создается благодаря генерации электронного возбуждения в реакциях активных форм кислорода (АФК) [2]. Возбужденное состояние крови и суспензий нейтрофилов (основные источники АФК в крови) является осциллятором, осуществляющим взаимодействие между отдельными источниками электронного возбуждения. Возбужденное состояние крови чрезвычайно чувствительно к самым малым колебаниям внешних фотонных полей, сверх-высоким разведениям некоторых веществ, но устойчиво к температурным изменениям (гистерезис ЭФ) [3, 4]. Эти данные предполагают, что кровь - высоко кооперативная неравновесная и нелинейная система, компоненты которой непрерывно взаимодействуют во времени и пространстве. По крайней мере, частично это свойство обеспечено способностью крови сохранять энергию электронного возбуждения, которое образуется в течение ее собственного нормального метаболизма [4]. С практической точки зрения анализ этих качеств крови может быть основой нового подхода к диагностическим процедурам [3].

1. Voeikov V.L., Asfaramov R., Bouravleva E.V., Novikov C.N., Vilenskaya N.D., *Indian J. of Experimental Biology*, 2003, 41, 473
2. Novikov C.N., Vilenskaya N.D., Leontieva O.A., Asfaramov R.R., Voeikov V.L., *Theoretical Biology Forum (ex. RIVISTA DI BIOLOGIA - BIOLOGY FORUM)*, *Tilgher-Genova (Italy)*, 2000, 93 (1), 152
3. Novikov K. N., Berdnikova N.G., Novikov A.K., Lyusina O.Yu., Muhitova O.G., Yablonskaya O.I., Do Minh Ha, Voeikov V.L., *Medical Science Monitor, Medical Science International Publishing (Poland)*, 2012, 18 (2), 76
4. Voeikov V.L., Novikov C.N., Vilenskaya N.D., *Journal of Biomedical Optics*, 1999, 4 (1), 54

**ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ ЦЕЛЕНТЕРАМИД-СОДЕРЖАЩИЙ
ПРОТЕИН ОБЕЛИН КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ БИОТЕСТ
НА РАДИАЦИОННУЮ ТОКСИЧНОСТЬ
Fluorescent coelenteramide-containing protein obelin as a perspective bioassay
for radiation toxicity**

Алена Петрова¹, Анна Луконина², Надежда Кудряшева^{2,3}

1 – Красноярский Государственный Аграрный Университет, Красноярск, 660049, Россия
2 – Сибирский Федеральный Университет, Красноярск, 660041, Россия
3 – Институт биофизики СО РАН, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», Красноярск, 660036, Россия
E-mail: aileenpetrova@gmail.com

Физико-химические механизмы токсических эффектов являются актуальным вопросом в современных фундаментальных исследованиях. Известно, что токсичность – биологическое понятие, определяемое как подавление физиологических функций организмов. Выявление токсичности связано с использованием биотестовых систем – начиная от высших и заканчивая клеточными организмами. В последние десятилетия развивается новое направление биотестирования, основанное на использовании ферментативных реакций (ферментативное биотестирование), которое переводит понимание токсических эффектов на молекулярный и макромолекулярный уровень. Следующим этапом должно стать изучение элементарных физико-химических процессов, лежащих в основе токсических эффектов. Целентерамид-содержащие флуоресцентные белки (ЦЛМ-СФБ) являются удобными биотестовыми системами для изучения токсических эффектов с физико-химических позиций.

Ранее была показана возможность оценки токсического влияния ряда деструктивных физико-химических факторов – экзогенных соединений (ряда спиртов, ДМСО), хронического воздействия повышенной температуры с помощью ЦЛМ-СФБ. В качестве представителя ЦЛМ-СФБ был использован разряженный обелин – продукт биоломинесцентной реакции гидрополипа *Obelia longissima*. Показано, что перечисленные факторы увеличивают вклад фиолетовой (410 нм), и уменьшают вклад сине-зеленой (500 нм) флуоресцентных компонент в видимой области спектра.

В данной работе рассмотрена возможность варьирования спектров флуоресценции обелина под действием еще одного фактора – радиоактивности, с использованием источника низкоинтенсивного бета-излучения. В качестве модельного источника низкоинтенсивного ионизирующего бета-излучения использовали радионуклид тритий в составе тритиевой воды (200 МБк/л).

В результате исследования выявлена высокая чувствительность разряженного обелина к низкодозовому излучению трития (изменение вкладов компонент наблюдалось уже на 2 день, поглощенная доза равна 0,03 Гр. Показана перспективность использования разряженного обелина в качестве цветного флуоресцентного биомаркера для анализа деструктивного воздействия низкодозовой радиации.

МЕХАНИЗМ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ГРИБОВ Bioluminescence mechanism of fungi

К. В. Пуртов

Институт биофизики СО РАН, Федеральный исследовательский центр
«Красноярский научный центр СО РАН», Красноярск, Академгородок, д. 50, стр. 50,
660036, Россия
E-mail: purtovk@mail.ru; тел: +7(391)243-15-79

Светящиеся грибы широко распространены на всех континентах, за исключением Антарктиды. На сегодняшний день открыто более 80 видов биоллюминесцентных грибов и их количество постоянно пополняется. Как и другие биоллюминесцентные организмы, грибы производят свет в результате внутренних химических реакций. Неоднократно были получены данные, свидетельствующие о единой природе этого феномена для всех светящихся грибов, однако химический механизм грибной люминесценции долгое время оставался неизвестным. Только в последние годы появились достоверные экспериментальные данные о ключевых участниках этого процесса. В 2015 г. нами была расшифрована химическая структура грибного люциферина – 3-гидроксигиспидина и установлен его метаболический предшественник – гиспидин, вторичный метаболит грибов и растений [1]. Экспериментально доказано, что образование люциферина на первом этапе процесса биоллюминесценции происходит при окислении гиспидина с помощью НАД(Ф)Н-зависимой гиспидин-3-гидроксилазы. На втором этапе, грибная люцифераза катализирует окисление 3-гидроксигиспидина, в результате чего происходит излучение кванта света. Именно наличием этих двух ферментов обусловлена способность грибов к биоллюминесценции.

В 2017 г. была расшифрована структура конечного продукта реакции биоллюминесценции грибов – оксилуциферина [2]. Благодаря результатам исследований в атмосфере меченого кислорода, удалось не только подтвердить структуру продукта реакции, но и предложить механизм того, как люциферин грибов превращается в испускающую свет молекулу. Кроме того, были получены синтетические аналоги люциферина грибов, отличающиеся спектром излучаемого света в процессе биоллюминесцентной реакции.

Работа выполнена при поддержке Гранта РФФИ № 16-14-00052.

1. Purto K.V., Petushkov V.N., Baranov M.S., Mineev K.S., Rodionova N.S., Kaskova Z.M., Tsarkova A.S., Petunin A.I., Bondar V.S., Rodicheva E.K., Medvedeva S.E., Oba Y., Oba Yu., Arseniev A.S., Lukyanov S., Gitelson J.I., Yampolsky I.V., *Angew. Chem.* 2015, 54, 8124
2. Kaskova Z.M., Dörr F.A., Petushkov V.N., Purto K.V., Tsarkova A.S., Rodionova N.S., Mineev K.S., Guglya E.B., Kotlobay A., Baleeva N.S., Baranov M.S., Arseniev A.S., Gitelson J.I., Lukyanov S., Suzuki Y., Kanie S., Pinto E., Di Mascio P., Waldenmaier H.E., Pereira T.A., Carvalho R.P., Oliveira A.G., Oba Y., Bastos E.L., Stevani C.V., Yampolsky I.V., *Science Advances*, 2017, 3 (4) e1602847

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ СЛЮНЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ФИЗИЧЕСКОГО ЗДОРОВЬЯ МОЛОДЕЖИ Bioluminescence testing of saliva in evaluating physical health of youth

Людмила Степанова^{1*}, Оксана Коленчукова³, Дмитрий Гульнов¹,
Галина Жукова¹, Валентина Кратасюк^{1,2}

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

2 – ИБФ СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, 660036, Россия

3 – Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, Красноярск, 660022, Россия

*E-mail: slyudmila@mail.ru; Tel: +7(960)773-58-51

Профилактическое направление в медицине оценивает уровень здоровья молодежи множественными количественными критериями [1]. Экспрессное лабораторное диагностирование состояния здоровья можно проводить по слюне с использованием биоллюминесцентного метода, который был апробирован нами ранее для выявления степени эндотоксикоза при различных заболеваниях [2, 3]. Поэтому целью исследования явилось использование биоллюминесцентного тестирования в оценке физического здоровья молодежи.

Биоллюминесцентное тестирование слюны девушек и юношей в возрасте 18–19 лет проводили с использованием бактериальной биферментной системы: NADH:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза. Свечение регистрировали на планшетном люминометре (Berthold Technologies, Германия). Влияние слюны определяли по остаточному свечению, вычисляемому как отношение максимальных интенсивностей свечения в присутствии слюны и фосфатного буфера (контроль). Для статистической обработки использовали непараметрический критерий Манна-Уитни.

Выявлено, что слюна физически здоровых представителей юношеского возраста, имеющих нормальную массу тела, мезоморфный тип телосложения с жировой массой не более 15±0,5 кг, ингибировала свечения биоллюминесценции до 18,8±0,8% независимо от пола и типа соматотипирования исследуемых. Медиана остаточного свечения снижена при дефиците массы тела и повышена - при избытке. Величина остаточного свечения коррелирует с результатами биоимпендансного исследования (основной обмен веществ, активная клеточная масса, сопротивление тканей и др.) (n=106; r_s=0,5; p<0,05) и результатами хемиллюминесцентного тестирования слюны (светосумма, максимальная интенсивность свечения и др.) (n=106; r_s=0,6; p<0,05).

Во время стресса (экзаменационный период) остаточное свечение возрастало до 55,7±0,9%. Биохимическое изменение состава слюны в этот период может быть связано с увеличением микровязкости слюны до 32±0,4% и деградацией антиоксидантной защиты из-за уменьшения активности ферментов пероксидазной защиты.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 16-06-00439).

1. Шабунова А.А., *Вологда: ИСЭРТ РАН*, 2010, 408
2. Esimbekova E., Kratasyuk V., Shimomura O. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, 2014, 144, 67
3. Kratasyuk V., Esimbekova E., *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2015, 18 (10), 952

**АНАЛИЗ ИНГИБИРУЮЩЕГО ВОЗДЕЙСТВИЯ
НАНОМАТЕРИАЛОВ НА АКТИВНОСТЬ РЯДА ФЕРМЕНТОВ**
Analysis of the inhibitory effects of nanomaterials on the activity of some enzymes

Яна Фрицлер¹, Елена Есимбекова^{1,2}, Валентина Кратасюк^{1,2}

1 – Сибирский федеральный университет, пр. Свободный, 79, Красноярск, 660041, Россия
2 – ИБФ СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Академгородок, 50/50, Красноярск 660036, Россия
E-mail: fri.yana@mail.ru

Увеличение масштаба производства, а также использования в хозяйственной деятельности человека новых наноматериалов обостряет проблемы оценки безопасности их применения для человека и биосферы в целом [1]. В настоящее время, при проведении токсикологических исследований наноматериалов основными объектами воздействия являются клеточные линии, а также лабораторные живые организмы. В данной работе предлагается использовать в качестве объектов воздействия ключевые ферменты различных метаболических путей. Проведена оценка степени воздействия наночастиц на активность следующих ферментов: трипсина, алкогольдегидрогеназы (ADH), NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы (R) и бутирилхолинэстеразы. Также проведено сравнение чувствительности ферментативных реакций, катализируемых оксидоредуктазами, к воздействию наночастиц в зависимости от длины цепи сопряжения реакций в ряду – моноферментная реакция, катализируемая R, биферментная система NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза (R+L) и триферментная система R+L+ADH.

Для проведения исследования использовали коммерчески доступные наночастицы на основе металлов: SiO₂, TiO₂ и Ag. Степень воздействия наночастиц на активность ферментов оценивали по величинам IC₂₀ и IC₅₀, которые равны концентрациям наночастиц, вызывающим изменение параметра ферментативной реакции на 20 и 50 % соответственно. Во избежание искажения биолуминесцентного сигнала эффектом фильтра были изучены абсорбционные характеристики наночастиц и проведена необходимая корректировка результатов [2].

При проведении анализа воздействия наночастиц на активность ферментов были получены зависимости типа «доза-эффект». Показано, что наночастицы серебра в большей степени ингибируют активность моноферментных реакций, биферментной системы R+L и триферментной системы R+L+ADH по сравнению с наночастицами SiO₂ и TiO₂. В исследуемых диапазонах концентраций наночастиц токсичность уменьшается в ряду Ag > TiO₂ > SiO₂. Степень ингибирования активности ферментов увеличивается при увеличении размеров наночастиц. Среди ферментативных систем наиболее чувствительны к воздействию наночастиц моноферментные реакции, катализируемые редуцтазами ADH и R. Показано, что удлинение цепи сопряжения реакций, катализируемых оксидоредуктазами, не приводит к увеличению чувствительности ферментативных систем к воздействию наноматериалов.

1. Vance M.E., Kuiken T., Vejerano E.P., McGinnis S.P., Hochella M.F. Jr, Rejeski D., Hull M.S., *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 2015, 6, 1769
2. Алешина Е.С., Болодурин И.П., Дерябин Д.Г., Кучеренко М.Г., *Журнал Вестник ОГУ*, 2010, 6 (112), 141

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

**ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО
АППАРАТА ФИТОПЛАНКТОНА ВОДОЕМА ПО ИНДУКЦИИ
ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В МОДЕЛИ ФОТОСИСТЕМЫ II**
**Quantifying fluorescence yield and O₂ generation in wild algal samples with
Photosystem II model during lake renewal**

**Наталья Е. Беляева¹, Павел А. Ермаченко², Галина Ю. Ризниченко¹,
Иван В. Конюхов¹, Сергей И. Погосян¹**

1 – Department of Biophysics, Biology Faculty of the M.V. Lomonosov Moscow State University, 119992, Moscow, Russia; E-mail: natalmurav@yandex.ru
2 – «Биосфера и Экотехнологии», Ростов-на-Дону; E-mail: neo-ecology@mail.ru

Современные методы исследования состояния фотосинтетического аппарата микроводорослей предложены для мониторинга цикла восстановления биопродуктивности проточного водоема. Выявлены отличия процессов для проб фитопланктона из каскада трех водоемов (р Темерник, г. Ростов-на-Дону): пруд №1 в антисанитарном состоянии, пруд №2 после летования с высокой биопродуктивностью (контроль) и нижний пруд №3 с цветущей водой. Для предварительного анализа кривые индукции флуоресценции (ИФ) хлорофилла (Хл) лабораторного штамма *Chlorella* измерили на флуорометрах собственной конструкции: стационарном «МЕГА 25» с плотностью мощности света (PFD) 7500 μmol photons m⁻² s⁻¹ и портативном, PFD 4500 μmol photons m⁻² s⁻¹ [1].

На центрифугированных пробах фитопланктона прудов с помощью портативного флуорометра измерили ИФ на интервале до 1 с после 5-ти минут адаптации в темноте. Эффективность первичных процессов фотосистемы 2 (ФС2) водорослей (F_v/F₀) для контроля (пруд №2) имела наибольшее значение и соответствовала измеряемой *in vivo* [2]. Значение F_v/F₀ водорослей снижено в «пруду №3» и минимально в «пруду №1». Для анализа результатов измерений кривых ИФ применили модель ФС2 [2].

Фитирование модели ФС2 по кривой ИФ водорослей из пруда №2 (контроль) обеспечивает параметры, аналогичные результатам для лабораторного штамма *Chlorella*. Фитирование ИФ фитопланктона пруда №3 получили увеличивая на 50% вклад флуоресценции Хл, не ассоциированного в антенные комплексы ФС2. Тот же параметр для пруда №1 был увеличен на 100%, что можно связать с деградацией антенных комплексов или увеличением содержания цианобактерий в пробе. К тому же, в сравнении с «контроль» и «пруд №3» усредненная по S_i состояниям константа скорости реакции донирования электрона на P680⁺ РЦ ФС2 от марганцевого комплекса (ВОК) для пробы «пруд №1» снижена более, чем в два раза. В итоге, расчеты «пруд №1» показали эффект 10-ти кратного снижения генерации O₂ в РЦ ФС2, что объяснимо ингибированием ВОК.

Работа исследует способы мониторинга природных фотосинтезирующих систем при восстановлении их устойчивого функционирования с высокой биопродуктивностью.

1. Погосян С.И., Гальчук С.В., Казимирко Ю.В., Конюхов И.В., Рубин А.Б. (2009) Вода: Химия и экология № 6, 34-40
2. Belyaeva N, Bulychiev A, Riznichenko G, Rubin A (2011) *Biophysics*, 56:464-477

**ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ
ФОТООБРАЗОВАНИЯ ВОДОРОДА В КЛЕТКАХ *C. reinhardtii*
В УСЛОВИЯХ БИОГЕННОГО ГОЛОДАНИЯ
Physiological role of hydrogen photoproduction in green microalgae under
nutrient starvation**

Алёна Волгушева, Тарас Антал, Галина Кукарских, Татьяна Кренделева

Биологический факультет Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия
E-mail: volg-alena@yandex.ru; Fax: +7(495)939-11-15

Зеленая микроводоросль *Chlamydomonas reinhardtii* способна переключать свой метаболизм с аэробного, когда конечным акцептором электронов является кислород, на анаэробный, при котором происходит активация реакций ферментативного брожения, а притоны могут использоваться в качестве акцептора электронов. Переход в анаэробноз может быть вызван цветением водоемов, недостатком света, минеральных веществ, активностью гетеротрофной микробиоты и т.д.

Процесс восстановления протонов до молекулярного водорода (H_2) в зеленых водорослях осуществляется высокоэффективной хлоропластной [Fe-Fe]-гидрогеназой, чувствительной к присутствию молекулярного O_2 , который образуется в ФС2 на свету. На сегодняшний день разработано несколько подходов, основанных на недостатке в среде некоторых макроэлементов, которые позволяют решить проблему несовместимости между кислород-выделяющей активностью ФС2 и гидрогеназной реакцией.

В частности, дефицит серы индуцирует деградацию большинства белков, участвующих в расщеплении воды и ассимиляции двуокиси углерода, что приводит к снижению активности фотосинтеза и установлению анаэробных условий, индуцируя экспрессию гидрогеназы и фотопродукцию водорода. Большая часть электронов для синтеза H_2 (до 80%) обеспечивается за счет остаточной активности ФС2 в голодающих клетках, остальная часть (порядка 20%) поступает в ЭТЦ за счет нефотохимического восстановления пула пластохинонов из стромы.

В данной работе, мы исследовали роль фотообразования водорода в адаптации клеток *C. reinhardtii* к условиям серного голодания путем сравнения дикого типа и мутанта HydEF без гидрогеназной активности. Показано, что присутствие активной гидрогеназы в клетках снижает скорость фотодеструкции ФС2, повышает общую антиоксидантную активность, поддерживает гликолиз за счет более эффективной деградации крахмала, и, в целом, повышает жизнеспособность культуры, которую оценивали по соотношению живых и мертвых клеток. Вероятно, положительная роль процесса фотообразования водорода в условиях биогенного голодания обусловлена поддержкой процессов окислительного и фотофосфорилирования.

**КУЛЬТИВИРОВАНИЕ СООБЩЕСТВА ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ
В ФОТОБИОРЕАКТОРЕ ДЛЯ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД
ГОРОДСКИХ ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ
Green algae community cultivation in photobioreactor for municipal wastewater
treatment**

Е. Н. Воронова, Э. В. Волкова, Н. М. Щеголькова, С. И. Погосян

Биологический факультет МГУ имени М. В. Ломоносова, РФ, 119234, г. Москва,
Ленинские Горы 12
E-mail: pogosyan@biophys.msu.ru; факс. +7(495)939-11-15

Фотоавтотрофные микроорганизмы (микроводоросли) способны утилизировать химические загрязнители (органические вещества, соли тяжелых металлов, биогенные элементы) из промышленных и канализационных сточных вод. Для поддержания выбранной ассоциации водорослей и эффективного использования энергии света рекомендуется применение закрытых фотобиореакторов (ФБР) с интенсивным перемешиванием биомассы. Одним из наиболее эффективных с точки зрения фотофизических свойств и технологичным является кольцевой ФБР. Измерения параметров флуоресценции хлорофилла позволяют на ранних стадиях выявить причины снижения эффективности фотосинтеза клетками водорослей (дефицит минерального питания, токсичные загрязнения и др.). Спектры поглощения света суспензией позволяют контролировать скорость роста водорослей и корректировать условия освещения в биофотореакторе в режиме реального времени, не повреждая клеток.

В экспериментах была использована вода, полученная с городских очистных сооружений, прошедшая стадии биологической очистки и готовая к сбросу в природные водоемы (БОВ). В этой воде сохраняется довольно высокая концентрация биогенных элементов – соединений азота и фосфора. Для утилизации биогенных элементов были выбраны сообщества микроводорослей с преобладанием *Chlorella sorokiniana* и *Scenedesmus quadricauda*.

Значительные накопления биомассы водорослей наблюдаются уже через 5 часов после смешения водорослей с БОВ. Высокая эффективность фотосинтеза в течение всего времени культивирования свидетельствует о хорошем физиологическом состоянии культуры водорослей и правильном подборе условий культивирования. Аммонийный, нитратный и нитритный азот практически полностью удаляются из БОВ в течение одних суток пребывания в ФБР с суспензиями *Chlorella* или *Scenedesmus*. Содержание общего азота в БОВ через сутки снижается почти в 40 раз. В процессе работы фототрофного звена очистки БОВ почти в 3 раза снижается содержание фосфатов. Видимо, дальнейшее снижение концентрации фосфатов не происходит в связи с лимитированием по азоту, который к этому времени практически полностью извлечен из среды.

**АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ СИСТЕМА
МОНИТОРИНГА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ
МИКРОВОДОРОСЛЕЙ В ФОТОБИОРЕАКТОРАХ**

An automatic system for monitoring the physiological state of algae in photobioreactors

Иван Конохов

Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова, Биологический факультет, кафедра биофизики. 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 24
E-mail: vanka.kon@gmail.com

Микроскопические водоросли находят применение в различных областях биотехнологии – в производстве биологически ценных веществ, при очистке промышленных сточных вод и газов, а также в методах биологического тестирования качества водной среды. Достижение высокой скорости роста водорослей в фотобиореакторах (ФБР) напрямую связано с обеспечением оптимальных условий для фотосинтеза – необходимой интенсивности светового облучения, температуры, pH, концентрации растворенных газов (O_2 и CO_2) и минеральных элементов.

Оптимизация условий культивирования микроводорослей представляет непростую задачу и требует постоянного наблюдения за скоростью деления клеток в культуре. Для прямого определения скорости роста клеток требуется достаточно длительный промежуток времени (0.5–2 часа), в течение которого численность клеток должна измениться, по меньшей мере, на 5–10%. Косвенно судить о возможном лимитировании роста можно по параметрам флуоресценции хлорофилла *in vivo*.

Разработанные для этих целей флуориметры (Walz-Германия, Hansatech-Великобритания, PSI-Чехия) за счет специальных приемов возбуждения флуоресценции определяют целый набор параметров флуоресценции, которые служат для экспресс-оценки функционального состояния клеток микроводорослей. Однако при попытке использовать эти модели приборов для наблюдения за процессом культивирования микроводорослей в фотобиореакторах возникают существенные ограничения.

На кафедре биофизики Биологического факультета МГУ создана система мониторинга состояния микроводорослей в плотных суспензиях клеток. Она состоит из блока отбора и транспортировки проб, фотометрического модуля (спектрофотометр, флуориметр, проточная кювета), резервуара с чистой водой и ПК. Фотометрический модуль регистрирует спектр поглощения пробы в области 400–750 нм и определяет, какой процент падающей световой энергии усваивается в первичных процессах фотосинтеза (по флуоресценции хлорофилла). Система испытана в опытах по выращиванию одноклеточной зеленой водоросли *Chlorella vulgaris* внутри ФБР (1 л). Показано, что установка обладает большим динамическим диапазоном по содержанию хлорофилла в суспензии клеток (от 0.1 до 300 мг/л). За счет быстрой и регулярной промывки внутренние стенки фотометрической кюветы оставались чистыми в течение 8-дневных опытов.

Оснащение ФБР такой системой открывает новые пути управления процессом культивирования. Известно, что параметры флуоресценции хлорофилла позволяют обнаружить возникающие в процессе культивирования неблагоприятные условия гораздо раньше, чем произойдет замедление роста культуры. Это дает технологам возможность действовать «на опережение»: своевременно и в нужном направлении изменять интенсивность освещения фотобиореактора, регулировать минеральный состав среды и скорость поступления CO_2 .

В программу управления на ПК был заложен простейший алгоритм, который обеспечивает автоматическое регулирование интенсивности освещения ФБР на основе регулярно поступающей информации об эффективности фотосинтеза в клетках водорослей. Показано, что автоматическое регулирование позволяет, при одних и тех же энергозатратах на освещение фотобиореактора, увеличить выход биомассы на 38%.

**ЗЕЛЁНАЯ МИКРОВОДОРОСЛЬ *Coelastrella rubescens* КАК
ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК КЕТОКАРОТИНОИДОВ И ЛИПИДОВ
Green algae *Coelastrella rubescens* as a promising source of ketocarotenoids and lipids**

**Галина Минюк¹, Элина Челебиева¹, Ирина Чубчикова¹, Наталья Данцюк¹,
Ирина Дробецкая¹, Роман Сидоров², Алексей Соловченко³**

¹ – Институт морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского, Севастополь, 299011, Россия

E-mail: gsminyuk@mail.ru; Fax: +7(8692) 55-78-13

² – Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва, 35127276, Россия

³ – Биологический факультет МГУ имени М. В. Ломоносова, 119234 Москва, Россия

Coelastrella (Scotiellopsis) rubescens Kaufnerova et Elias 2013 (Chlorophyceae, Sphaeropleales) относится к группе коккоидных микроводорослей, обитающих на поверхности почвы и подверженных значительным суточным и сезонным флуктуациям условий внешней среды (влажности, температуры, инсоляции и др.). Одной из главных биологических характеристик таких видов является высокая толерантность к факторам абиотического стресса, обусловленная способностью быстро (иногда несколько раз в сутки) и обратно переходить от активной вегетации в состояние покоя. У *C. rubescens*, как и у некоторых других эдафофильных водорослей порядка Sphaeropleales, эта особенность неразрывно связана с индукцией в клетках двух тесно сопряженных адаптивных процессов – вторичного каротиногенеза и синтеза триацилглицеринов.

В серии натуральных и лабораторных экспериментов по исследованию влияния условий внешней среды на рост и метаболизм *C. rubescens* показано, что продуктивность культур этого вида по суммарным каротиноидам (Кар) и липидам при двухстадийном методе культивирования может достигать 2.7 мг/(л сут) и 67.4 мг/(л сут) соответственно. Содержание Кар в биомассе, собранной на заключительной стадии культивирования, составляет 0.8–1.2% сухого вещества (СВ), а содержание липидов – 30–50% СВ. В составе суммарных Кар доминируют кетокаротиноиды (ККар) (67.8–90.1% от суммы), представленные смесью различных форм астаксантина (Аст) (20.5–34.2%) и его ближайших метаболических предшественников, характеризующихся исключительно высокой АО-активностью: кантаксантина (8.6–12.7%), адониксантина (Адк) (9.1–12.5 %), свободных Аст и Адк (5.8–8.4%) и эхиненона (1.7–5.4%). Кроме того, в экстрактах Кар присутствуют б-каротин (3.2–13.7%) и зеаксантин/лютеин (11.5–37.9 %), являющиеся, по всей вероятности, смесью фотосинтетических и вторичных (цитоплазматических) форм.

В жирнокислотном составе суммарных липидов, выделенных из «зеленой» биомассы, до 51–52 масс% приходится на две эссенциальные ЖК (линолевую и а-линоленовую), что указывает на ее потенциальную пригодность для производства различного рода БАД, кормов и косметики. Красная биомасса, благодаря физико-химическим характеристикам преобладающих мононенасыщенных (C18:1^{Δ9}) и насыщенных кислот (C16:0) может служить сырьем для получения качественного биодизеля, отвечающего требованиям международных стандартов.

БИОФИЗИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФОТОБИОТЕХНОЛОГИИ

С. И. Погосян

Биологический факультет Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, МГУ, д.1 стр.12
E-mail: pogosyan@biophys.msu.ru; Тел.: +7(495)9395150; факс: +7(495)9391115

Одним из основных противоречий, затрудняющих развитие фотобиотехнологии, состоит в том, что в природе фототрофные микроорганизмы, как правило, распределены в водной толще с очень низкой средней плотностью клеток в объеме, а для биотехнологического использования необходимо создать на порядки более высокие плотности клеток, чем в природе. Важнейшим устройством в системе, обеспечивающей эффективную фотобиотехнологию, является фотобиореактор (ФБР). До настоящего времени не выработано единого мнения о конструкции ФБР, наиболее полно отвечающего требованиям фотобиотехнологии и, в частности, оборудованных системой поддержания оптимальных условий культивирования фототрофных микроорганизмов. Такое культивирование должно базироваться на системах автоматизированного непрерывного контроля состояния фототрофных микроорганизмов и регулирования параметров работы ФБР. Для оценки состояния фототрофных микроорганизмов наиболее целесообразно использовать методы контроля, базирующихся на представлениях о функционировании фотосинтетического аппарата. В частности, на анализе параметров флуоресценции хлорофилла при частотной и амплитудной модуляции возбуждающего света. Параметры флуоресценции хлорофилла позволяют оценивать как текущее состояние фотосинтетического аппарата, так и следить за его изменениями в ходе культивирования фототрофных микроорганизмов. На основе знания о механизмах регуляции фотосинтетического аппарата и влияния внешних условий может быть выработана программа управления для оптимизации процесса культивирования в ФБР.

Одной из главных задач при выборе конструкции ФБР является оптимизация условий освещения суспензии микроорганизмов. С ростом интенсивности света коэффициент использования поглощенного света в процессах фотосинтеза непрерывно снижается. Как правило, у светолюбивых фототрофных микроорганизмов антенный комплекс пигментов, относящийся к реакционному центру, имеет малое эффективное сечение поглощения за счет относительно малого количества молекул фотосинтетических пигментов в нем.

При высокой оптической плотности суспензии фототрофных микроорганизмов в ФБР, когда относительно тонкий слой клеток практически полностью поглощает свет, интенсивное перемешивание суспензии приводит к тому, что клетки попеременно оказываются то при высоком освещении, то в условиях затенения. Таким образом, могут быть созданы более благоприятные условия для прироста биомассы фототрофных микроорганизмов. Из общепринятых представлений о механизме реакций фотосинтеза следует, что переход клетки из интенсивно освещенной в темную зону должен происходить за доли секунды. Такой режим позволяет использовать запасенную организмом энергию света, полученную в кратковременный период интенсивного освещения, в виде восстановленных промежуточных продуктов в темных стадиях фотосинтеза. Оптимальные периоды времени пребывания клеток фототрофных микроорганизмов на интенсивном свете и в тени зависят от интенсивности светового потока и специфики организма. Увеличение времени между фазами освещения и темноты должно приводить к снижению прироста фотосинтетической продукции фототрофных микроорганизмов в ФБР. При интенсивности света выше $1000 \text{ ммоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ время воздействия света должно составлять примерно 10 мс для поддержания высокой эффективности фотосинтеза при высоких оптических плотностях суспензии водорослей.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ АСТАКСАНТИНА ИЗ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ Biotechnological production of astaxanthin with microalgae

Алексей Соловченко

Биологический факультет МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва, 1192234, Россия
E-mail: solovchenko@mail.bio.msu.ru; Fax: +7(495)939-43-09

Кетокаротиноид астаксантин (Аст) – мощнейший природный антиоксидант с противовоспалительным, противоопухолевым, кардио- и нейропротекторным эффектами. Аст широко используется для производства пищевых добавок, функционального питания и кормов для аквакультуры. Разработаны подходы к химическому синтезу Аст, преобладающего на рынке кормовых добавок, для употребления человеком разрешен только натуральный Аст, рынок которого исчисляется сотнями миллионов долл. США. Богатейший источник натурального Аст – зеленая микроводоросль *Haematococcus pluvialis* Flotow, культивируемая в промышленных масштабах для получения этого пигмента.

В благоприятных условиях *H. pluvialis* существует в виде зеленых вегетативных клеток, которые при действии стрессоров (свет высокой интенсивности, дефицит азота и (или) фосфора, экстремальные температуры) превращаются в обогащенные Аст (до 5–6% сухого веса) неподвижные апланоспоры – гематоцисты, исключительно толерантные к неблагоприятным условиям среды. Вегетативные клетки метаболически активны, быстро делятся и не содержат Аст, тогда как гематоцисты характеризуются замедленным метаболизмом и приспособлены для переживания длительных периодов неблагоприятных условий. Для достижения максимального выхода Аст применяют т.н. двухфазное культивирование. На первой фазе культивируют вегетативные клетки в благоприятных для деления клеток условиях. По достижении высокой плотности культуру подвергают стрессам, вызывающих накопление Аст и превращение вегетативной клетки в гематоцисту.

Трудности биотехнологического получения Аст из микроводорослей связаны с медленным ростом большинства известных штаммов *H. pluvialis* и уязвимости культур для контаминации. Как следствие, промышленное культивирование *H. pluvialis* возможно только в закрытых системах (фотобиореакторах), и только вторая фаза может осуществляться в открытых прудах. Чрезмерная интенсивность стрессового воздействия может приводить к высокой смертности клеток.

Найдены новые штаммы микроводорослей – эффективных продуцентов Аст. Так, новый штамм *H. pluvialis* IPPAS H-2018 пригоден для культивирования в солоноватых водах, что существенно снижает себестоимость культивирования. Альтернативные продуценты, такие как *Chromochloris zofingiensis*, более стабильны в интенсивном культивировании. Новые данные о физиологии вторичного каротиногенеза у *H. pluvialis* позволяют правильно рассчитать интенсивность стрессового воздействия и свести к минимуму смертность клеток. В докладе обсуждаются физиологические и фотобиологические основы устойчивого культивирования каротиногенных микроводорослей для эффективного биотехнологического получения Аст.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и образования РФ (проект 14.616.21.0080).

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА СПЕКТРАЛЬНОЙ
МУЛЬТИЭКСПОНЕНЦИАЛЬНОЙ АППРОКСИМАЦИИ КИНЕТИКИ
ИНДУКЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА ДЛЯ ОЦЕНКИ
СОСТОЯНИЯ КУЛЬТУРЫ МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ**
**Application of spectral multiexponential approximation of chlorophyll
fluorescence transient to assess the state of microalgae culture**

Сергей Хрушев, Татьяна Плюснина, Наталья Дегтерева

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра биофизики, Ленинские Горы 1, стр. 12, Москва 119234, Россия
E-mail: styx@biophys.msu.ru; +7(495)939-14-02

Измерение кинетики нарастания (индукции) флуоресценции хлорофилла при освещении клеток микроводорослей и растений – широко применяемый метод определения эффективности первичных процессов фотосинтеза в экологическом мониторинге, агро- и биотехнологии. Зависимость интенсивности флуоресценции от времени носит сложный многофазный характер и содержит информацию о различных стадиях переноса электрона в электрон-транспортной цепи хлоропласта. Появление дополнительных или исчезновение типичных фаз на индукционной кривой свидетельствует об изменении характера функционирования фотосинтетического аппарата в ответ на изменение внешних условий. Предложенный нами метод спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации кривой индукции флуоресценции [1] формализует процедуру определения числа фаз этой кривой и их количественных характеристик и позволяет проводить оперативный анализ большого объема экспериментальных данных. На основе предложенного метода нами создано специализированное программное обеспечение ruPhotoSyn, позволяющее проводить комплексный анализ кривых индукции флуоресценции. Программа написана на языке Python и может использоваться в операционных системах Windows, Linux и MacOS.

Разработанный метод был использован для непрерывного мониторинга состояния зеленых одноклеточных водорослей *Chlorella vulgaris* и *Chlamydomonas reinhardtii* при выращивании в накопительной культуре в фотобиореакторе. Измерение индукционных кривых проводили при возбуждении синим светом (455 нм, 5500 мкЭ/м²/с) после 3 минут адаптации к темноте. Показано, что наступление условий минерального голодания культуры может быть идентифицировано по появлению дополнительной визуально неразличимой фазы на индукционной кривой. Характерное время дополнительной фазы составляет около 200 мкс для *Chlorella vulgaris* в условиях дефицита азота и около 50 мкс для *Chlamydomonas reinhardtii* при культивировании на среде без серы. Появление этой фазы может быть связано с перераспределением светособирающих комплексов между фотосистемами I и II, а также с нарушением функции кислород-выделяющего комплекса фотосистемы II. При дальнейшем развитии минерального голодания происходит изменение характерных времен и амплитуд более поздних стадий индукции флуоресценции, что, вероятно, обусловлено изменением относительного содержания двух типов фотосистем и размера пула пластохинона.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №17-04-00676.

1. Плюснина Т.Ю., Хрушев С.С., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. *Биофизика*, 2015, 60(3), 487

**ОСОБЕННОСТИ АДАПТАЦИИ ФОТОАВТОТРОФНЫХ
КУЛЬТУР МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ К НЕДОСТАТКУ СЕРЫ
В АЭРОБНЫХ И АНАЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ**
**Adaptation of microalgae to sulfur deprivation under aerobic and anaerobic
conditions**

Анатолий А. Цыганков, Вера И. Гречаник

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук, Институтская, 2, Пушкино, Московская область, 142290, Россия
E-mail: ttt-00@mail.ru

Микроводоросль *Chlamydomonas reinhardtii* способна к синтезу двух гидрогеназ в анаэробных условиях и светозависимому выделению водорода. Квантовый выход данного процесса в определенных условиях близок к 1, но ингибируется выделяющимся при этом кислородом, поэтому в обычных условиях протекает краткосрочно. В условиях недостатка серы, азота или фосфора при изоляции культур от атмосферы микроводоросли снижают активность фотосистемы 2 до уровня ниже уровня дыхания и спонтанно переходят в анаэробные условия с последующим длительным выделением водорода. При этом показано, что инактивация фотосистемы 2 происходит частично обратимо за счет перераспределения пула пластохинонов. Это связано с пониженным потреблением НАДФН вследствие замедления развития клеток из-за недостатка серы. Вместе с тем, указанные данные получены с использованием фотогетеротрофных культур. Данных в отношении адаптации фотоавтотрофных культур к недостатку серы в аэробных и анаэробных условиях немного.

Целью данной работы было сравнение ростовых и флуоресцентных характеристик фотоавтотрофных культур, находящихся в аэробных и анаэробных условиях при недостатке серы.

Эксперименты проводили в фотобиореакторе на основе коаксиальных цилиндров с освещением лампами, находящимися на оси цилиндров. Проводили периодическое культивирование с компьютеризированным контролем температуры, pH, концентрации кислорода, оптической плотности. К фотобиореактору был подсоединен ПАМ флуориметр (JUNIOR PAM, WALTZ), позволяющий измерять F_0' и F_v . Подобрана среда, в которой рост культур происходил до концентрации хлорофилла 60 мг/л без лимитирования минеральными компонентами.

Показано, что в подобранной среде рост культур при продувке газовой смесью воздух +3% CO₂ реальный квантовый выход фотосинтеза не снижался при увеличении концентрации клеток до 60 мг/л. В то же время при продувке культур смесью аргона с углекислотой после достижения концентрации клеток 30 мг/л реальный квантовый выход начинал снижаться вместе с содержанием кислорода в среде. При недостатке серы реальный квантовый выход начинал снижаться как в аэробных, так и в анаэробных условиях практически одинаково. В отличие от фотогетеротрофных культур в анаэробных условиях не наблюдалось скачкообразного изменения реального квантового выхода.

В докладе обсуждаются возможные механизмы регуляции ФС2, приводящие к изменению реального квантового выхода в разных условиях.

Работа поддержана грантом РФФИ 15-14-30007.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Allard-Vannier, Emilie – 100
 Bolle, Cordelia – 59
 Bolotine, Lina – 88
 Brenner, Wolfram – 52
 Chourpa, Igor – 100
 Gericke, К.-Н. – 93
 Golbeck, John – 24, 31
 Herbrich, S. – 93
 Hervé-Aubert, Katel – 100
 Oswald, C. – 93
 Pawlowski, Katharina – 52
 Pohl, P. – 82
 Redding, Kevin E. – 44
 Yacoby, Iftach – 44
 Аверчева, Ольга – 45
 Айбуш, Арсений – 89, 99, 105, 112
 Акимов, С. А. – 82
 Алескерова, Л. Э. – 116
 Алиева, Роза – 117, 127
 Аллахвердиев, С. И. – 94, 108
 Ананич, Татьяна – 107
 Антал, Тарас – 138
 Антоненко, Ю. Н. – 71, 90
 Арбекова, П. В. – 73
 Арбуханова, П. М. – 63
 Арутюнян, Александр – 33
 Астафьев, Артём – 99, 105, 112
 Ашихмин, Александр – 39, 47
 Баврина, Анна – 66, 67
 Балашов, Сергей – 60
 Барулин, Николай – 76
 Барцев, Сергей – 123, 131
 Бассарская, Елизавета – 45
 Батищев, О. В. – 82
 Башмакова, Евгения – 118
 Белашов, А. В. – 68, 98
 Белик, В. П. – 80, 98
 Беликов, Николай – 91, 92, 97
 Белов, Александр – 35
 Белозерская, Татьяна – 54
 Бельтюкова, Д. М. – 80
 Беляева, Наталья Е. – 20, 137
 Беляева, Ольга – 45
 Беляева, Т. Н. – 68
 Бендиксис, А. С. – 72
 Бердникова, Надежда – 132
 Бережная, Елена – 70
 Берцова, Юлия – 55
 Богачев, Александр – 55
 Большачева, Ю. В. – 34
 Большаков, Максим – 39
 Борзенко, С. А. – 63
 Борисова-Мубаракшина, Мария – 41, 43
 Борисов, Кирилл – 88
 Босхомджиева, Баина – 26
 Брегадзе, Владимир – 85
 Буглак, А. А. – 62
 Булычев, Александр А. – 20, 40
 Буравлева, Екатерина – 132
 Буракова, Людмила – 119, 120
 Бушук, Сергей – 76
 Варфоломеев, Сергей – 91, 92, 97
 Васильева, Людмила – 21
 Васютинский, О. С. – 68, 80, 93, 98
 Ведяшкина, Ольга – 46
 Венгуроли, Джованни – 31
 Ветошкина, Дарья – 41, 43
 Вечтомова, Ю. Л. – 56, 62
 Власова, Татьяна – 45
 Воденев, Владимир – 48, 49
 Воейков, Владимир – 132
 Войцеховская, Ольга – 51, 52, 57
 Волгушева, Алёна – 138
 Волкова, Елена – 109, 115
 Волкова, Э. В. – 139
 Волошин, Р. А. – 94
 Воробей, Александр – 95
 Воронова, Е. Н. – 139
 Воропай, Евгений – 79, 102
 Высоцкий, Евгений – 119, 120, 122, 123, 128, 130
 Вышедко, Александра – 121
 Габдулхаков, Азат – 21
 Гаврильчик, А. Н. – 82
 Гаджиев, И. М. – 80, 98
 Галимзянов, Т. Р. – 82
 Гармаза, Юлия – 96
 Герасимова, Надежда – 111
 Гопта, Оксана – 24, 31
 Горбунова, Дарья – 122

Горбунова, Ю. Г. – 82
 Горохов, Владимир – 25
 Горшкова, Дарья – 45
 Горяченко, Александр – 78
 Гостев, Фёдор – 37, 89
 Гречаник, Вера И. – 145
 Грин, Михаил – 69, 74, 85
 Гроза, Наталья – 54
 Громова, Е. Н. – 48
 Гульнов, Дмитрий – 135
 Давлетшина, Лира Н. – 32
 Данцюк, Наталья – 141
 Дегтерева, Наталья – 28, 144
 Демина, Ольга – 91, 92, 97
 Демьяненко, С. В. – 84
 Демьяненко, Светлана – 75
 Дмитриева, Валерия – 52, 57
 Дробецкая, Ирина – 141
 Дударева, Л. В. – 58
 Евкайкина, Анастасия И. – 51, 57
 Еремеева, Елена – 119, 120, 123
 Ермаченко, Павел А. – 137
 Ермолаева, Светлана – 87
 Есимбекова, Елена – 126, 136
 Ефременко, Анастасия – 85
 Жармухамедов, С. К. – 94, 108
 Жердева, Виктория – 78
 Жигалова, Татьяна – 45
 Жихорева, А. А. – 68, 98
 Жукова, Галина – 121, 135
 Журавлёва, Зинаида – 47
 Журикова, Елена – 42
 Забелин, Алексей – 22
 Залесский, Александр Д. – 99, 106
 Зараменских, Елизавета – 103
 Зорина, Татьяна – 88
 Зорин, Владимир – 79, 88, 114
 Зубрицкая, Галина – 124
 Иванова, Александра Н. – 51, 52, 57
 Иванов, Борис – 41, 42, 43, 44
 Игнатова, Анастасия – 85, 100
 Игнатова, Людмила – 42
 Исмаилов, Анвар Д. – 116, 125
 Казачкина, Наталия – 78
 Калябина, В. П. – 126
 Каприн, А. Д. – 86
 Катаркевич, Василий – 107
 Кирпичников, Михаил – 111
 Кленина, И. Б. – 29
 Климова, Екатерина – 57
 Климов, В. В. – 23
 Кнорре, Д. А. – 71
 Кнюкшто, Валерий – 83, 107
 Князев, Д. – 82
 Ковалева, А. А. – 71
 Ковалева, Вера – 70
 Ковель, Е. С. – 127
 Козлова, Екатерина – 101
 Козлов, А. С. – 72, 73
 Козулева, Марина – 41, 43, 44
 Коленчукова, Оксана – 121, 135
 Колесник, Ольга – 121
 Комарова, Анна В. – 40
 Конюхова, Юлия – 115
 Конюхов, Иван – 137, 140
 Коппель, Лариса – 59
 Корватовский, Борис – 25
 Корнилова, Е. С. – 68
 Коршунова, Г. А. – 90
 Костров, Андрей – 99, 105
 Котова, Е. А. – 71, 90
 Котова, Елена – 111
 Кочетова, Галина – 45
 Кочубей, Вячеслав – 101, 109, 115
 Кравченко, Ирина – 88, 114
 Красицкая, Василиса – 118
 Красновский, А. А. – 72, 73
 Кратасюк, Валентина А. – 121, 126, 131, 135, 136
 Кренделева, Татьяна – 138
 Креславский, Владимир – 53
 Крицкий, М. С. – 56, 62
 Кудряшева, Надежда – 117, 127, 133
 Кузьмин, В. А. – 63
 Кукарских, Галина – 138
 Кутько, Анна – 124
 Лавыш, Андрей – 102
 Ларионова, Марина – 122, 128, 130
 Левин, Петр – 91, 92, 97
 Леонова, Мария – 36
 Леусенко, Игорь – 76, 83, 107
 Лизунова, Екатерина – 46
 Лиман, Мустафа – 76
 Лисица, Альберт – 131
 Ломакина, Галина – 129
 Луговский, Александр – 102

Луговский, Анатолий – 114
 Лукаткин, Александр – 46
 Лукаткин, Андрей – 46
 Лукашев, Евгений – 60
 Лукин, Алексей – 91, 92, 97
 Луконина, Анна – 127, 133
 Любимов, Валерий – 53
 Любицкий, О. Б. – 73
 Людникова, Т. А. – 62
 Мажуль, М. М. – 116
 Малахов, Михаил – 103
 Маликова, Наталья – 119, 120
 Малиновская, Светлана – 66, 67
 Малова, Т. И. – 64
 Малфerrarри, Марко – 31
 Малюченко, Наталья – 111
 Мамедов, Адалят – 55
 Мамедов, Махир – 23, 24, 26, 31, 32, 37, 55, 60
 Маркова, Светлана – 119, 120, 122, 128, 130
 Маскевич, Александр – 102
 Маслов, Михаил – 103
 Матросов, Антон – 103
 Махнева, Зоя – 39, 47
 Мигяев, Очир – 87
 Микулич, Александр – 76, 83, 107
 Милановский, Георгий – 24, 26, 31
 Минюк, Галина – 141
 Миронов, Андрей Ф. – 69, 74, 85
 Монич, Виктор – 66, 67
 Москаленко, Андрей – 39, 47
 Мохаммед, Аммар – 104
 Мудрилов, М. А. – 48
 Надточенко, Виктор А. – 37, 89, 99, 105, 106, 112
 Назаров, П. А. – 71, 90
 Найдов, Илья – 43
 Наташин, Павел – 119, 120
 Невежин, Евгений – 87
 Негинская, Мария – 70, 75
 Негребцкий, Вадим – 87
 Немцева, Елена – 131
 Новикова, Анастасия – 101, 104
 Новиков, Алексей – 132
 Новиков, Кирилл – 132
 Нокс, Петр – 25
 Ольшевская, В. А. – 71
 Осипов, А. Н. – 73
 Островский, М. А. – 63
 Осыченко, Алина А. – 99, 105, 106, 112
 Пашенко, Владимир – 25
 Перковская, Алла – 124
 Петрова, Алена – 127, 133
 Петрова, Анастасия – 24, 26, 31, 37
 Петров, Н. В. – 68
 Петров, Петр – 78, 79
 Петровская, Лада – 60, 92
 Пищальников, Роман Ю. – 27
 Плавская, Людмила – 83, 107
 Плавский, Виталий – 76, 83, 107
 Плюснина, Татьяна – 28, 144
 Погосян, Сергей И. – 137, 139, 142
 Притьмов, Д. А. – 74
 Прокопишко, Юлия – 131
 Проскураков, И. И. – 29
 Пуртов, К. В. – 134
 Пурцхванидзе, Виолетта – 77, 81
 Разживин, Андрей П. – 27, 30
 Ризниченко, Галина Ю. – 20, 137
 Роговцов, Сергей – 76
 Родионова, М. В. – 94, 108
 Родькин, Станислав – 70
 Рожко, Т. В. – 127
 Рубин, Андрей Б. – 20, 40
 Савенко, Ольга – 101
 Савицкий, Александр – 78
 Сагайдачная, Елена – 109, 115
 Салова, А. В. – 68
 Самцов, Михаил – 78, 79, 102, 114
 Сасин, М. Э. – 93
 Сачкова, А. С. – 127
 Себорян, Гаяне – 105
 Селиханов, Георгий – 21
 Семенова, И. В. – 68, 80, 98
 Семенов, Алексей – 23, 24, 26, 31, 37
 Семин, Борис К. – 32
 Серобян, Гаянэ – 99
 Сиваев, Игорь – 85
 Сидоров, Роман – 141
 Силецкий, Сергей – 60
 Симаков, Юрий – 77, 81
 Синещёков, Виталий – 59
 Скапцов, Александр – 101, 104
 Скарга, Владислав – 103
 Слобожанина, Екатерина – 96, 110, 124

Смолин, А. Г. – 93
 Соколов, В. С. – 82
 Соловченко, Алексей – 141, 143
 Соловьев, Дмитрий – 92
 Степанова, Людмила – 121, 135
 Степанюк, Галина – 119
 Степура, Виталий – 102
 Странадко, Е. Ф. – 64
 Стриж, Ирина – 61
 Студитский, Василий – 111
 Султанов, Даниель – 111
 Сухова, Е. М. – 50
 Сухов, Владимир – 48, 49, 50
 Сырчина, Мария – 99, 105, 112
 Сысолятина, Елена – 87
 Таисова, Александр – 33
 Тамашевский, Александр – 96, 110
 Тарасов, Дмитрий – 78
 Телегина, Т. А. – 56, 62
 Терехова, И. В. – 34
 Титов, Андрей – 89, 105
 Торгашина, И. Г. – 126
 Третьякова, Антонина – 83, 107
 Тучин, Валерий – 115
 Тютерева, Елена В. – 51, 52, 57
 Тютяев, Евгений – 46
 Угарова, Наталья – 129
 Узденский, А. Б. – 84
 Улащик, Владимир – 83
 Усталков, Сергей – 101
 Фельдман, Т. Б. – 63
 Феофанов, Алексей – 85, 100, 111
 Фетисова, Зоя – 33
 Филоненко, Е. В. – 86
 Франк, Людмила – 118
 Фрицлер, Яна – 136
 Фуфина, Татьяна Ю. – 21, 29
 Хайлова, Л. С. – 90
 Хатыпов, Равиль – 21
 Хлудеев, Иван – 79
 Хмельницкий, Антон – 36
 Ходонов, Андрей – 91, 92, 97
 Хоробрых, А. А. – 23
 Хохлов, Даниил – 35
 Христин, Антон – 22, 36
 Хрущев, Сергей – 28, 144
 Худякова, Александра – 53
 Цыганков, Анатолий А. – 145

Челебиева, Элина – 141
 Черенкова, Татьяна – 33
 Черепанов, Дмитрий – 24, 26, 31, 37
 Чижов, Игорь – 92
 Чубчикова, Ирина – 141
 Чупин, Владимир – 92
 Шаркаева, Эльвера – 46
 Шахов, Александр – 99, 105, 106, 112
 Шелаев, Иван – 37, 89
 Ширшикова, Галина – 53
 Шкуропатова, Валентина – 22
 Шкуропатов, Анатолий – 21, 22
 Шмиголь, Татьяна – 87
 Штернин, П. С. – 93
 Шувалов, Владимир – 21, 36, 38
 Шумский, Алексей – 91, 92
 Шушин, Анатолий – 113
 Щеголькова, Н. М. – 139
 Яблонская, Ольга – 132
 Яковец, Илья – 88, 114
 Яковлева, М. А. – 63
 Яковлев, Андрей – 33, 38
 Янина, Ирина – 115
 Янковский, Игорь – 88
 Яныкин, Д. В. – 23

LI-COR

ЛАБ Инструментс

Подразделение **LI-COR Environmental** компании **LI-COR** (США) (www.licor.com) является ведущим производителем приборов для изучения растений, включая системы изучения процессов фотосинтеза (измерение флуоресценции хлорофилла, измерение газообмена растений), приборов для измерения площади листьев и покрытия кроны, датчиков уровня освещенности и регистраторов к ним, а также газоанализаторов, систем экологического мониторинга и много другого.

Новая система анализа процессов фотосинтеза **LI-COR LI-6800**

Беспрецедентные возможности для измерения параметров газообмена растений и флуоресценции хлорофилла. Новое поколение самой цитируемой системы в мире.

Система анализа процессов фотосинтеза **LI-COR LI-6400**

Проверенное временем качество и надежность, широкий спектр возможностей, широкий ассортимент рабочих камер.

Анализатор проективного покрытия кроны **LI-COR LAI-2200C**

Быстрый и точный неразрушающий анализ листового индекса трав, кустарников и древесных насаждений.

Регистраторы освещенности **LI-COR LI-250A** и **LI-COR LI-1500**

LI-COR LI-250A – одноканальный регистратор для записи сигнала

LI-COR LI-1500 – трехканальный регистратор для записи и анализа сигналов

Интуитивный интерфейс, надежность, ударопрочность, водонепроницаемость.

Датчики уровня освещенности, температуры, влажности и др.

Наземные и подводные датчики ФАР, радиометры, фотометрические датчики, пиранометрические датчики, датчики температуры воздуха / почвы, датчики влажности воздуха / почвы, и многие другие.

Анализаторы площади листовой поверхности и других параметров листа

LI-COR LI-3000C - портативный анализатор площади листа

LI-COR LI-3100C – лабораторный анализатор площади листа

Анализ площади, длины, максимальной ширины и усредненной ширины листа.

Компания ЛабИнструментс - официальный эксклюзивный представитель компании LI-COR в РФ и странах СНГ

Россия, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10 (ИБХ РАН), оф. 32-306

Тел./факс: +7 (499) 72-488-72, +7 (495) 223-2815, +7 (495) 669-2094

Ответственный представитель поставщика:

к.х.н. Анцыпович Сергей Игоревич

sa@labinstruments.ru www.labinstruments.ru



СПЕЦЛАБПРОЕКТ
лабораторное оборудование

WALZ

Компания СпецЛабПроект специализируется на поставках лабораторного оборудования для изучения растений.

Компания СпецЛабПроект эксклюзивно представляет в России и странах СНГ продукцию немецкой компании **Heinz Walz**.

Компания Heinz Walz - признанный мировой лидер в производстве приборов для изучения фотосинтетической активности и газообмена растений.



Система измерения газообмена растений **GFS-3000FL**

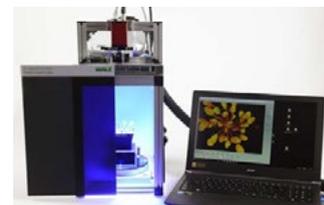


NEW! Флуориметр **PHYTO-PAM II**

Компания Heinz Walz предлагает широкий выбор приборов для изучения растений. Прежде всего это **импульсные флуориметры**, предназначенные для изучения фотосинтетической активности растений методом измерения уровня флуоресценции хлорофилла.

Также в ассортименте компании **Walz** имеются высокопроизводительные **системы измерения газообмена растений** серии **GFS-3000**, которые могут быть объединены с различными импульсными флуориметрами в единые универсальные программно-аппаратные комплексы для одновременного получения данных по газообмену и флуоресценции хлорофилла.

Компания Heinz Walz предлагает также приборы для определения точки росы, измерители уровня освещенности, датчики к ним и многое другое.



NEW! Флуориметр **3D IMAGING-PAM**



NEW! Флуориметр **MINI-PAM II**

Приборы **Walz** применяются в биологии, ботанике, физиологии растений, селекции, агрономии, растениеводстве, биотехнологиях, экомониторинге и других областях. **Компания Walz** производит как оборудование для исследований в условиях лаборатории, так и портативные мобильные приборы для работы в полевых условиях.

Создание приборов **Walz** проходит в тесном сотрудничестве с ведущими учеными, занимающимися изучением фотосинтеза и смежных научных дисциплин, что даёт компании **Walz** возможность оставаться мировым лидером в производстве наукоемкого оборудования, соответствующего последнему слову науки и техники.

ООО «СПЕЦЛАБПРОЕКТ»

Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, к. 2, эт. 4, пом. 1, к. 33.

Тел.: +7(499)391-7042 walz@spezlab.ru

www.spezlab.ru www.heinzwalz.ru www.walz.com

Подписано в печать 01.09.2017 г.
Печать трафаретная
Усл.п.л. – 1,5
Заказ № б/н
Тираж: 100 экз.
Типография “11-й ФОРМАТ”
ИНН 7726330900
115230, Москва, Варшавское ш., 36
+7 (499) 788-78-56
www.autoreferat.ru

ISBN 978-5-9905822-3-1



9 785990 582231