



RSP

РОССИЙСКОЕ ФОТОБИОЛОГИЧЕСКОЕ
ОБЩЕСТВО
RUSSIAN SOCIETY FOR PHOTOBIOLOGY
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ
БИОЛОГИИ
INSTITUTE OF BASIC BIOLOGICAL PROBLEMS
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО НАУКЕ
И ИННОВАЦИЯМ
РОССИЙСКИЙ ФОНД ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
RUSSIAN FOUNDATION FOR BASIC RESEARCH
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES

V Съезд

Российского фотобиологического общества

Международная конференция

“Преобразование энергии света при фотосинтезе”

International Conference

“Light Energy Conversion in Photosynthesis”

Пушино, 8–13 июня 2008 г.

Программа

Тезисы докладов

Пушино 2008

В настоящем сборнике представлены материалы V съезда Российского фотобиологического общества и проходившей в его рамках Международной конференции “Преобразование энергии света при фотосинтезе”.

Сборник предназначен для широкого круга биологов, химиков и физиков, интересующихся проблемами фотобиологии.

Ответственный редактор: д.ф.-м.н. И.И. Проскуряков

Ответственный за выпуск: к.б.н. Е.А. Павлова

ISBN 978-5-9562-0060-5

© ИФПБ РАН, 2008

© НИА-Природа, 2008

ОБРАЩЕНИЕ К УЧАСТНИКАМ

Дорогие друзья!

Мы рады приветствовать вас на V съезде Российского фотобиологического общества, который проводится в г. Пущино-на-Оке на базе Института фундаментальных проблем биологии РАН. В рамках съезда проводится международная конференция «Преобразование энергии света при фотосинтезе», в работе которой принимают участие ученые из США, Германии, Швеции, Белоруссии и Украины. Съезд и конференция проводятся при поддержке Федерального агентства по науке и инновациям и Российского фонда фундаментальных исследований.

Программа съезда включает следующие секции:

- 1) Первичные процессы фотосинтеза (сопредседатели: В.А. Шувалов, В.В. Климов, А.Ю. Семёнов);
- 2) Биохимия и регуляция фотосинтеза (сопредседатели: А.Н. Тихонов, Б.Н. Иванов);
- 3) Фоторецепция (сопредседатели: М.А. Островский, В.А. Синещёков);
- 4) Фотодинамическая терапия, фотофизика и фотохимия биомолекул (сопредседатели: Ю.А. Владимиров, А.Я. Потапенко, А.А. Красновский);
- 5) Флуоресцентные белки, биолюминесценция (сопредседатели: А.П. Савицкий, Н.Н. Угарова);
- 6) Современные оптические методы в фотобиологии (сопредседатели: В.В. Тучин, А.М. Сергеев).

На съезде будут представлены около 200 устных и стендовых докладов. Среди участников – 7 академиков и член-корреспондентов РАН, 53 доктора наук, 83 кандидата наук, 50 аспирантов и студентов. Среди участников – ученые из Москвы, Нижнего Новгорода, Пущино, Саратова, Воронежа, Красноярска, Томска, Ростова-на-Дону, Тулы, Киева и Минска.

Мы приветствуем вас в Пушинском научном центре и надеемся, что научные дискуссии окажутся плодотворными, а неформальное общение оставит у вас приятные воспоминания!

От имени Оргкомитета съезда

Президент Российского фотобиологического общества,
профессор А.Ю. Семенов

Директор Института фундаментальных
проблем биологии РАН, академик В.А. Шувалов

ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ:

А.Ю. Семёнов,

Институт физико-химической биологии МГУ – сопредседатель

В.А. Шувалов

Институт фундаментальных проблем биологии РАН – сопредседатель

Секретари:

Е.А. Павлова, ИФПБ РАН

О.М. Застрижная, ИФПБ РАН

Члены Оргкомитета:

Ю.А. Владимиров, РГМУ

Б.Н. Иванов, ИПФБ РАН

В.В. Климов, ИПФБ РАН

Л.А. Кошпель, Биологический факультет МГУ

Е.А. Котова, НИИФХБ МГУ

А.А. Красновский, ИНБИ РАН, Биологический факультет МГУ

М.Д. Мамедов, НИИФХБ МГУ

М.А. Островский, ИБХФ РАН

А.Я. Потапенко, РГМУ

И.И. Проскуряков, ИПФБ РАН

А.П. Савицкий, ИНБИ РАН

А.М. Сергеев, ИПФБ РАН

В.А. Синещёков, Биологический факультет МГУ

И.Г. Стриж, Биологический факультет МГУ

А.Н. Тихонов, Физический факультет МГУ

В.В. Тучин, Физический факультет СГУ

Н.Н. Угарова, Химический факультет МГУ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
MEETING PROGRAMME

Sunday, June 8

14 : 00 – 17 : 00 Registration at the “Pushchino” hotel

17 : 00 Opening Ceremony, Institute of Basic Biological Problems

**Vladimir Shuvalov (Co-chairman)
Alexey Semenov (Co-chairman)**

Special Lectures:

17 : 10 – 17 : 50 (40 min) *John GOLBECK*

(Pennsylvania State University, USA)

T1.1. The Role of the H-Bond to the A₁ Quinones in Photosystem I

17 : 50 – 18 : 30 (40 min) *Vladimir A. SHUVALOV, Maria M. LEONOVA, Ludmila G. VASILIEVA, Ravil A. KHATYPOV, Anatolii Ya. SHKUROPATOV and Anton A. KHMELNITSKY* (Institute of Basic Biological Problems, Russia)

T1.2. Primary Light-Energy Conversion in Tetrameric Chlorophyll Structure of Photosystem II and Bacterial Reaction Centers

Welcome Party at the Institute of Basic Biological Problems

Monday, June 9

International Conference ‘Light Energy Conversion in Photosynthesis’

Session I: Primary Processes of Photosynthesis

Chairpersons: ***З. А. В. В. Вах***
 Н. С. У. Ш. = Л. а

9 : 00 – 9 : 30 (30 min) *Alexey SEMENOV, Ivan SHELAEV, Fedor GOSTEV, Mahir MAMEDOV, Oleg SARKISOV, Victor NADTOCHENKO and Vladimir SHUVALOV*
(Moscow State University, Russia)

T1.3. Femtosecond Primary Charge Separation in Photosystem I

9 : 30 – 10 : 00 (30 min) *Vyacheslav KLIMOV*
(Institute of Basic Biological Problems, Russia)

T1.4. Possible Role of Bicarbonate in the Photosynthetic Water Oxidation

10 : 00 – 10 : 30 (30 min) *Mahir MAMEDOV*
(Moscow State University, Russia)

T1.5. Electrogenic Reactions Involving Photosystem II Turnover

10 : 30 – 10 : 50 (20 min) Break

10 : 50 – 11 : 20 (30 min) *Irina KLENINA, Aleksandr KUZMIN, Tatyana FUFINA and Ivan PROSKURYAKOV*
(Institute of Basic Biological Problems, Russia)

T1.6. Structural Changes Accompanying Electron Transfer from the Primary to the Secondary Electron Acceptor of Bacterial Reaction Centers

11 : 20 – 11 : 50 (30 min) *Mikhail L. ANTONKINE, Melissa KOAY, Boris EPEL, Christoph BREITENSTEIN, Oxana GOPTA, Eckhard BILL, Wolfgang GÄRTNER and Wolfgang LUBITZ*

(Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie, Germany)

T1.7. Modeling Binding Sites of Iron-Sulfur Clusters in Photosystem I

11 : 50 – 12 : 20 (30 min) *Andrey MOSKALENKO, Zoya Makhneva and Yuri Erokhin*

(Institute of Basic Biological Problems RAS, Russia)

T1.8. The Carotenoids of Sulfur Bacterium Capable to Produce Singlet Oxygen under Light

12 : 30 – 14 : 00 Lunch

Continuation of Session I

Parallel Meeting

Chairpersons: *3WKEVWah*
H&SUZWSH= L ah

14 : 00 – 14 : 30 (30 min) *Anatoly SHKUROPATOV, Aleksei ZABELIN, Tatyana FUFINA, Liudmila VASILIEVA, Margarita ZVEREVA, Valentina SHKUROPATOVA and Vladimir SHUVALOV*

(Institute of Basic Biological Problems, Russia)

T1.9. Purple Bacteria Reaction Centers with Modified Pigment and Aminoacid Composition

14 : 30 – 15 : 00 (30 min) *L.G. VASILIEVA, T.Y. FUFINA, R.A. KHATYPOV and V.A. SHUVALOV*

(Institute of Basic Biological Problems, Russia)

T1.10. Properties of *DZaVaTSUWleZSWa/Wa* Mutant I(L177)H Reaction Center

15 : 00 – 16 : 30 (30 min) *Roman Y. PISHCHALNIKOV, Marc G. MÜLLER and Alfred R. HOLZWARTH*

(Moscow State University, Russia)

T1.11. Energy Transfer and the Primary Charge Separation in the Isolated Reaction Center. Modelling of the Exciton Dynamics Based on the Pump-Probe Spectroscopy.

16 : 30 – 16 : 50 (20 min) Break

16 : 50 – 17 : 10 (20 min) *K.V. NEVEROV, Yu.V. KOVALEV and A.A. KRASNOVSKY*

(A.N. Bach Institute of Biochemistry, Moscow State University, Russia)

T1.12. On the Origin of two Chlorophyll Phosphorescence Bands in Chloroplast Thylakoids

17 : 10 – 17 : 30 (20 min) *N.E. BELYAEVA, A.A. BULYCHEV, G.Yu. RIZNICHENKO and A.B. RUBIN*

(Moscow State University, Russia)

T1.13. PS II Model Application to Analyze Chl S Fluorescence OJIP Rise, Monitored on *Bleg esfhg* Leaves after Ionophore Treatment

17 : 30 – 17 : 50 (20 min) *Albert GUSKOV, Jan KERN, Matthias BROSER, Azad GABDULKHAKOV, Athina ZOUNI and Wolfram SAENGER*

(Freie Universität Berlin, Germany)

T1.14. Lipids, Quinones and Channels – Current State of the Structural Model of Cyanobacterial Photosystem II

17 : 50 – 18 : 10 (20 min) *Peter A. MAMONOV, Pavel M. KRASILNIKOV, Peter P. KNOX and Andrew B. RUBIN*

(Moscow State University, Russia)

T1.15. Modelling of two Primary Quinone Conformations Influencing Electron Transfer Rate within *DZabZSWb/VWRC*.

Session I, Posters

P1.1. Azat GABDULKHAKOV, Albert GUSKOV, Matthias BROSER, Jan KERN, Athina ZOUNI and Wolfram SAENGER

Tunnels in Cyanobacterial Photosystem II

P1.2. Anastasiya ZOBOVA, Alexandra TAISOVA, Nataly FEDOROVA, Eugeny LUKASHEV, Ludmila BARATOVA and Zoya FETISOVA

Optimal Interfacing of Subantennae as an Efficient Strategy for Light Harvesting in Photosynthesis

P1.3. Gennady KOMISSAROV

About PS1 and PS2

P1.4. Maria M. LEONOVA, Lyudmila G. VASILIEVA, Ravil A. KHATYPOV, Anton Yu. KHMELNITSKYI and Vladimir A. SHUVALOV

Properties of the Photosynthetic Reaction Centers of *DZaVaTSUFW ebZSWb/VW* with Amino Acid Substitutions of Axial Ligands to Mg of the Monomer Bacteriochlorophylls

P1.5. Dmitrii MOISEEV

Multielectron Photosynthetic Water Oxidation to Ozone by Marine Red Algae

P1.6. Grigory RUDANOV, Ludmila G. VASILYEVA and Andrei P. RAZJIVIN

High Excitonic Band of BChl Dimer in RCs from Wild Type *DZaVaTSUFW ebZSWb/VW* and from Mutant with Substitution of Isoleucine L177 by Histidine. The Study by Means of High Order Derivative Spectroscopy

P1.7. Vasily KURASHOV, Sergey ZHARMUKHAMEDOV, Alexey SEMENOV, Mahir MAMEDOV

Photovoltage Measurements of Manganese-Depleted/Reconstituted Photosystem II Core Complexes Incorporated into Lipid Vesicles

P1.8. Vasily KURASHOV, Elena LOVYAGINA, Mahir MAMEDOV, Alexey SEMENOV, Ilya IVANOV and Boris SEMIN

Electron Transfer via the Low-Affinity Mn-Binding Site in the Mn-Depleted Photosystem II Core Complexes

P1.9. Sergey A. SILETSKY, Ilya BELEVICH, Audrius JASAITIS, Alexander A. KONSTANTINOV, Mårten WIKSTRÖM, Tewfik SOULIMANE and Michael I. VERKHOVSKY

Time-Resolved Study of TS_3 Cytochrome Oxidase from *FZWI ge FZWI abZl'ge*

P1.10. *A.A. SOLOV'EV and YU. E. EROKHIN*

Study of the Effect of Low pH Values on the Chromatophores, RC+LH1 Ensembles and LH2-Complexes Isolated from *3⁷aUZch Sffg* – [*gffee*]*g*

P1.11. *I. STEPANENKO, V. KOMPANETZ, S. CHEKALIN, A. MOSKALENKO and A. RAZJIVIN*

Two-Photon Fluorescence Excitation of Bacterial LH2 Complexes: the Contribution of “Dark” Carotenoid States?

P1.12. *Juri STOLOVITSKY*

New View of the P680 – Oxygenic Photosynthesis Primary Donor as Pheophytin Structure

P1.13. *Vladimir SUKHOV, Vladimir VODENEEV and Vladimir OPRITOV*

Elaboration and Analysis of a Mathematical Model of the Photosystem II in the Higher Plants

P1.14. *Tatiana Y. FUFINA, Lyudmila G. VASILIEVA, Ravil A. KHATYPOV and Vladimir A. SHUVALOV*

The Spectral and Photochemical Properties of H(L173)L+I(L177)H Mutant Reaction Center of Purple Bacterium *DZaVaTSUFWebZSWb/VW*

P1.15. *N. I. SHUTILOVA*

The Deciphering of the Interconnection Between the Structure and Photochemical Properties of the Oxygen-Evolving Complex of Plants (The Way to a Nanotechnology)

P1.16. *Andrei G. YAKOVLEV, Tatiana A. SHKUROPATOVA, Lydmila G. VASILIEVA, Anatoli Ya. SHKUROPATOV and Vladimir A. SHUVALOV*

Wave Packet Motions Coupled to Electron Transfer in Reaction Centers of *5ZachXWgeSgd`fISUge*

P1.17. *Jens NIKLAS, Boris EPEL, Mikhail L. ANTONKINE, Sebastian SINNECKER, Maria-Eirini PANDELIA and Wolfgang LUBITZ*

The Electron Acceptor Quinone A₁ of Photosystem I Investigated by Pulse EPR and ENDOR Spectroscopy

P1.18. *Il'ya NAGOVIJSYN, Galina CHUDINOVA, Vitaly KRASOVSKII, Dmitry TSCHERBAKOV, Valery SAVRANSKY, Gennady IONOV, Nikolay SMIRNOV, Gennady SINKO and Gennady KOMISSAROV*

Optical and Photoelectrochemical Properties of Pigment System Modeling Photosynthesis

19 : 00 – 20 : 00 Supper

20 : 00 Poster Discussion

Понедельник, 9 июня
Параллельное заседание

Секция 6: Современные оптические методы в фотобиологии

Флуоресцентные зонды и фотосенсибилизаторы

Председатель: *Ульянов Александр Владимирович*

14 : 00 – 14 : 30 (30 мин.) *Александр Сергеевич ТАТИКОЛОВ*
(Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва)
Д6.1. Полиметиновые красители как спектрально-флуоресцентные и кинетические зонды для биомакромолекул

14 : 30 – 15 : 00 (30 мин.) *Валерий В. ТУЧИН, Элина А. ГЕНИНА, Елена С. ТУЧИНА, Алексей Н. БАШКАТОВ, Георгий В. СИМОНЕНКО, Вера Н. ШЕРС-ТНЕВА, Илья В. ЯРОСЛАВСКИЙ, Григорий Б. АЛЬГШУЛЕР*
(Саратовский государственный университет, Саратов)
Д6.2. Фотодинамическая и селективная фототермическая терапия угревой сыпи

15 : 00 – 15 : 20 (20 мин.) *Павел ПРОНКИН, Александр ТАТИКОЛОВ*
(Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва)
Д6.3. Безызлучательный перенос энергии в комплексах карбоцианиновых красителей и ДНК

15 : 20 – 15 : 40 (20 мин.) *Ина ПАНОВА, Петр ЛЕВИН, Александр ТАТИКОЛОВ*
(Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва)
Д6.4. Исследование внутренних сред организма с помощью фотохимических зондов

15 : 40 – 16 : 00 (20 мин.) *Андрей ТИХОМИРОВ, Татьяна ШМИГОЛЬ, Александр ПОТАПЕНКО*
(Российский государственный медицинский университет, Москва)
Д6.5. Резонансное светорассеяние (РСР) агрегатов красителей: мероцианин 540 (МЦ540)

16 : 00 – 16 : 20 (20 мин.) *Елена В. МИГАЧЕВА, Александр Б. ПРАВДИН*
(Саратовский Государственный Университет, Саратов)
Д6.6. Влияние иммерсионного просветления на автофлуоресценцию склеры *W/h/a*

16 : 20 – 16 : 40 (20 мин.) Перерыв

Нанобиофотоника и микроскопия

Председатель: *Орлов Александр Александрович*

16 : 40 – 17 : 00 (20 мин.) *Татьяна ЗДОБНОВА, Эвелина ЭДЕЛЬВЕЙС, Сергей ДОРОФЕЕВ, Роман ВАСИЛЬЕВ, Владимир Зломанов, Сергей ДЕЕВ*
(Институт биоорганической химии РАН, Москва)

Д6.7. Флуоресцентные комплексы направленного действия – конъюгаты полупроводниковых нанокристаллов и противораковых мини-антител

17 : 00 – 17 : 20 (20 мин.) *Георгий С. ТЕРЕНТЮК, Гариф Г. АКЧУРИН, Ирина Л. МАКСИМОВА, Галина Н. МАСЛЯКОВА, Лейла В. СУЛЕЙМАНОВА, Валерий В. ТУЧИН, Борис Н. ХЛЕБЦОВ, Николай Г. ХЛЕБЦОВ, Александр В. ШАНТРОХА*

(Саратовский государственный университет, Саратов)

Д6.8. Применение золотых наночастиц для селективной фототермической терапии злокачественных новообразований

17 : 20 – 17 : 40 (20 мин.) *Гариф АКЧУРИН, Георгий АКЧУРИН, Борис ВЕКслЕР, Игорь КОЛБЕНЕВ, Ирина МАКСИМОВА, Владимир МАКСИМОВ, Игорь МЕГЛИНСКИЙ, Оксана НАУМОВА, Александр СКАПЦОВ, Борис ХЛЕБЦОВ, Николай ХЛЕБЦОВ*

(Саратовский государственный университет, Саратов)

Д6.9. Детектирование плазмонно-резонансных наночастиц низко-когерентным и конфокальным оптическим томографом для технологии лазерного фототермолиза

17 : 40 – 18 : 00 (20 мин.) *Anna DRUZHKO, Nikolai BURYKIN, Dmitriy STEPANCHIKOV, Elena KORCHEMSKAYA*

(Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino)

Д6.10. Gelatin films based on bacteriorhodopsin and some its analogs and their isotropic and anisotropic properties

18 : 00 – 19 : 00 Стендовая сессия 6

Обсуждение стендов

С6.1. Ольга ДЯЧУК, Анна ТКАЧЕНКО

Люминесцентные исследования физико-химических свойств модифицированных биоматриц

С6.2. Ирина Л. МАКСИМОВА, Никита М. РЫСКИН, Георгий С. ТЕРЕНТЮК

Особенности иммунного ответа при лазерной гипертермии опухолей

С6.3. Андрей Г. МЕЛЬНИКОВ

Изучение внутримолекулярной динамики альбумина методом триплет-триплетного переноса энергии между люминесцентными зондами

С6.4. Елена С. ТУЧИНА

Фотодинамическое воздействие красного светодиодного излучения (625 нм) на микроорганизмы кожи человека

Tuesday, June 10

International Conference ‘Light Energy Conversion in Photosynthesis’

Session II: Biochemistry and Regulation of Photosynthesis

8 : 30 – 9 : 00 (30 min) *A.B. RUBIN*

(Moscow State University, Russia)

T2.1. Electron Transport in Photosynthesis and its Regulation

9 : 00 – 9 : 30 (30 min) *Irina ELANSKAYA, Victoria TOPOROVA, Vera GRIVENNIKOVA, Elena MURONETS, Lira DAVLETSHINA, Eugeny LUKASHEV and Kirill TIMOFEEV*

(Moscow State University, Russia)

T2.2. Role of NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase Encoded by DrgA Gene in Regulation of Electron Transport in Thylakoid Membranes of the Cyanobacterium *Ek`WZaUkef*esp. PCC 6803

9 : 30 – 10 : 00 (30 min) *Alexey FROLOV, Vasilii PTUSHENKO, Boris TRUBITSIN and Alexander TIKHONOV*

(Moscow State University, Russia)

T2.3. pH-Dependent Regulation of Electron Transport in Chloroplasts

10 : 00 – 10 : 30 (30 min) *Alexander MALYAN*

(Institute of Basic Biological Problems RAS, Russia)

T2.4. Properties and Functions of “Noncatalytic” Sites of Chloroplast ATP Synthase

10 : 30 -10 : 50 (20 min) Break

10 : 50 – 11 : 20 (30 min) *Alexander BULYCHEV and Natalia KRUPENINA*

(Moscow State University, Russia)

T2.5. Spatial Patterns of Photosynthesis and Proton Transport in the Excitable Plant Cell

11 : 20 – 11 : 50 (30 min) *Lyudmila IGNATOVA, Natalia RUDENKO, Tatiana FEDORCHUK and Boris IVANOV*

(Institute of Basic Biological Problems RAS, Russia)

T2.6. Low Molecular Mass Carbonic Anhydrases Bound with Pigment-Protein Photosystem Complexes of Higher Plants

11 : 50 – 12 : 20 (30 min) *Tatiana SHUTOVA, Hella KENNEWEG, Joachim BUCHTA, Julia NIKITINA, Vasily TERENTYEV, Sergey CHERNYSHOV, Bertil ANDERSSON, Suleyman ALLAKHVERDIEV, Vyacheslav KLIMOV, Holger DAU, Wolfgang JUNGE and Goran SAMUELSSON*

(Umeå University, Sweden)

T2.7. The Photosystem II-Associate Cah3 in *5ZS_ kvā_ a`Se* Enhances the O₂ Evolution Rate by Proton Removal

12 : 30 – 13 : 30 Lunch

Continuation of Session II

13 : 30 – 14 : 00 (30 min) *Boris IVANOV, Maria MUBARAKSHINA and Sergey KHOROBRYKH*

(Institute of Basic Biological Problems RAS, Russia)

T2.8. Interaction of Oxygen Pool with Plastoquinone Pool in Thylakoid Membranes

14 : 00 – 14 : 30 (30 min) *Vera OPANASENKO and Lilia VASJUKHINA*

(Institute of Basic Biological Problems RAS, Russia)

T2.9. Regulation of Ammonium Uncoupling in Chloroplasts

14 : 30 – 15 : 00 (30 min) *Anatoly TSYGANKOV*

(Institute of Basic Biological Problems RAS, Russia)

T2.10. Hydrogen Photoproduction by Purple Bacteria. Problems and Prospects

Poster Session II

Chairpersons:

*3MS`Wl? SAs`
4ade;hS`ah*

P2.1. Elizaveta BASSARSKAYA, Olga AVERCHEVA, Yuliy BERKOVICH, Tatiana ZHIGALOVA, Alexey EROKHIN and Svetlana SMOLYANINA

The Photochemical and Photophosphorylation Activity in Chloroplasts from *Adiantum Urtica* L. Plants Grown under Light-Emitting Diodes with Different Lighting Levels

P2.2. Maksim BOLSHAKOV, Zoya MAKHNEVA and Andrey MOSKALENKO

Photooxidation of Bacteriochlorophyll Dimers of LH2 Complexes in the Membranes of *Spirillum rubrum* Depending on the Content and Composition of Carotenoids

P2.3. Yu.V. BOLYCHEVTSEVA, I.V. TEREKHOVA, M. ROEGNER and N.V. KARAPETYAN

Regulation of P700 Transients by the Level of NADP(H) in *Spirillum rubrum* Cells

P2.4. Liudmila KABASHNIKOVA, Larisa ABRAMCHIK, Galina SAVCHENKO and Nataliya PSHYBYTKO

Structure and Function of Chloroplast and Mitochondria of Barley (*Cereale hordeastrum*) under Heat Shock

P2.5. I.M. KARTASHOV and E.N. MUZAFAROV

Participation of Adenylate Kinase of the Chloroplasts in Regulation of Energy Exchange

P2.6. A.N. KHUSNUTDINOVA, G.N. SHIRSHIKOVA, O.A. POSTNIKOVA, H.A. BATYROVA, A.M. BOUTANAIEV and A.A. TSYGANKOV

Renaturation of Thermostable Hydrogenase HydSL Derived from the Purple Sulfur Phototrophic Bacterium *FZaUSbeS cheWbWU* Using Heterologously Expressed Subunits

P2.7. M.A. KOZULEVA and Boris IVANOV

Relative Contributions of Ferredoxin and Membrane-Bound Carriers to Oxygen Reduction

P2.8. Natalia KRUPENINA, Alexander BULYCHEV, Rob ROELFSEMA and Ulrich SCHREIBER

Action Potential Affects the Photosynthetic Pattern of *5ZSc UcbM S* Cell

P2.9. Ilya V. KUVYKIN, Alexey V. VERSHUBSKIY, Vasily V. PTUSHENKO and Alexander N. TIKHONOV

Effects of Oxygen on Light-Induced Redox Transients of P_{700} and Chlorophyll Fluorescence in C_3 -Leaves

P2.10. Ilya V. KUVYKIN, Vasily V. PTUSHENKO, Ludmila V. OZEROVA, Sergey Kiselev, Olga P. SAMOYLOVA and Alexander N. TIKHONOV

Effects of Pre-Illumination on Chlorophyll Fluorescence of *FdSMUS`fIS* Leaves

P2.11. Galina LYSENKO and Valentina GINS

Decrease of the Oxygen Reduction Rate in Winter Wheat Chloroplasts during the Process of Hardening

P2.12. Galina LYSENKO

Simultaneous Photoreduction of Oxygen to Superoxide Anion-Radical and Hydrogen Peroxide by Pea Chloroplasts

P2.13. Galina LYSENKO, Irina STRIZH

Oxygen as the Electron Acceptor in Wheat Chloroplasts under Drought Stress

P2.14. Elena PAVLOVA and Alexander MASLOV

Comparison of Light Dependence of Nitrate Uptake in Free Living Green Algae *5ZadWS* and Symbiotic Green Algae *FdWagj IS*

P2.15. Alexey PIGOLEV, Sergey ZHARMUKHAMEDOV and Vyacheslav KLIMOV

Functional Characteristics of Photosystem II in the Dark Grown *beTA* Mutant *5ZS_kVa_a`SedWZSdMII*

P2.16. Marina PIKULENKO, Natalia KRUPENINA and Alexander BULYCHEV

Visualization of Structural and Functional Heterogeneity in *3`fZaUWbe* Chloroplast

P2.17. Olga V. POBEGUTS, Tatiana N. SMOLOVA and Vyacheslav V. KLIMOV

Protective Effect of Bicarbonate Against Extraction of the Extrinsic Proteins of the Water-Oxidizing Complex from Photosystem II Membrane Fragments

P2.18. Olexandr POLISHCHUK, Nataliya TOPCHIIY and Elena ZOLOTAREVA

Influence of Heavy Metal Ions on Dark Relaxation Kinetics of Variable Chlorophyll Fluorescence in Chloroplasts

P2.19. POSTNIKOVA O.A., KHUSNUTDINOVA A.N., SHIRSHIKOVA G.N., BATYROVA H.A., TSYGANKOV A.A. and BUTANAIEV A.M.

Modification of the HydSL Hydrogenase from the Purple Sulphur Phototrophic Bacterium *FZaUsbeS deVbWU`S* by His-Tagging C-End of its Small Subunit

P2.20. Valentina RASSADINA and Illja KORAN

Protochlorophyllide Resynthesis and Chlorophyllide Esterification in Postetiolated Barley Leaves Treated with Carotenoid Biosynthesis Inhibitor Norflurazon

P2.21. A.K. ROMANOVA, V.A. MUDRIK, A.R. IGNAT'EV, N.S. NOVICHKOVA and B.N. IVANOV

Chlorophyll SFluorescence and some Biochemical Characteristics of Sugar Beet Plant Leaves in Norm and Effects of Glucose Excess

P2.22. SHANDIEVA I.O., SAVANINA Ya.V., PHATTAHOV S.G., LEBEDEVA A.F., LOBAKOVA E.S. and BARSKII E.L.

Melafen as a Synthetic Growth Regulator: Effect on the Photosynthetic Organisms

P2.23. Анна ШЕСТАК, Артем НЕСОВ, Дмитрий КИСЕЛЕВСКИЙ, Виталий САМУИЛОВ

Регистрация образования активных форм кислорода в клетках листьев гороха с использованием 2',7'-дихлорфлуоресциндацетата

P2.24. Alexei SOLOVCHENKO and Mark MERZLYAK

Pigments and Photoadaptation in the Nitrogen-Starved Microalga *BSqVbZ'ade]`UeW*

P2.25. Irina STRIZH and Ksenija MUSHKINA

The Slow Kinetics of Chlorophyll Fluorescence Induction Reflects Arabidopsis Floral Transition

P2.26. Olexandr SYVASH, Kateryna DOVBYSH, Stefan VASYLCHENKO,

Nataliya TOPCHIIY and Elena ZOLOTAREVA

Functional Characteristics of Photosynthetic Apparatus of Tree Plants in Ontogenesis

P2.27. TEKUCHEVA D.N., LAURINAVICHENE T.V. and TSYGANKOV A.A.

Hydrogen Photoproduction by *DZaVaTSUW* Usbeg Sfg_B B10 Using By-Products of Starch-Containing Waste Fermentation

P2.28. Nataliya TOPCHIIY, Oleksandr POLISHCHUK and Elena ZOLOTAREVA

The Effect of Heavy Metals on the Content of Q_B Non-Reducing Photosystem II Centers in Leaves and Chloroplasts of Higher Plants

P2.29. Elena YEROFEEVA, Maria NAUMOVA and Alexandra SELEZENEVA

Change of the Photosynthetic Pigment Content in the Birch Leaf Lamina for Adaptation to Anthropogenic Load

P2.30. Elena ZOLOTAREVA, Vladimir PODORVANOV and Olexander POLISHCHUK

The Role of Bound Bicarbonate in Photosynthetic Proton Translocation

P2.31. Lilia VASJUKHINA and Vera OPANASENKO

Synergism in Action of Ammonium and Palmitic Acid in Uncoupling of Chloroplast Thylakoids

P2.32. Ольга КОКШАРОВА

Изменения уровня белков фотосинтеза в цианобактериальных мутантах по клеточному делению

P2.33. Alexander PRONIN and Alexander MALYAN

Interaction of Pyrophosphate with Noncatalytic Nucleotide Binding Sites of Chloroplast ATP Synthase

Bonfire Party

Среда, 11 июня

Параллельное заседание

Секция 5: Флуоресцентные белки, биолюминесценция

Структура и функции флуоресцентных и биолюминесцентных белков

Председатели: *АзАААААААА*
АААААААА

9 : 00 – 9 : 40 (40 мин.) *Сергей ЛУКЪЯНОВ*

(Институт биоорганической химии РАН, Москва)

Д5.1. Флуоресцентные белки как новый объект фотобиологии

9 : 40 – 10 : 10 (30 мин.) *Наталья УГАРОВА*

(Московский государственный университет, Москва)

Д5.2. Механизмы регуляции цвета биолюминесценции для люциферазы

СВЕТЛЯКОВ

10 : 10 – 10 : 40 (30 мин.) *Константин ЛУКЪЯНОВ*

(Институт биоорганической химии РАН, Москва)

Д5.3. Фотоактивируемые флуоресцентные белки

Перерыв 10 : 40 – 11 : 00

11 : 00 – 11 : 30 (30 мин.) *Александр САВИЦКИЙ, Олег САРКИСОВ, Алек-*

сандр НЕМУХИН, Белла ГРИГОРЕНКО, Ксения БРАВАЯ, Иван ШЕЛАЕВ, Алек-
сандр РУСАНОВ

(Институт биохимии РАН, Москва)

Д5.4. Фемтосекундная кинетика первичных фотопротеев в разгораю-
щемся белке KFP

11 : 30 – 12 : 00 (30 мин.) *Евгений ВЫСОЦКИЙ, John LEE*

(Институт биофизики СО РАН, Красноярск)

Д5.5. Механизм биолюминесценции Ca²⁺-регулируемых фотопротеев

12 : 00 – 12 : 20 (20 мин.) *Светлана МАРКОВА, Людмила БУРАКОВА, Ев-*

гений ВЫСОЦКИЙ

(Институт биофизики СО РАН, Красноярск)

Д5.6. Многообразие целентеразин-зависимых биолюминесцентных бел-
ков

12 : 00 – 12 : 35 (15 мин.) *Михаил КОКШАРОВ, Н. УГАРОВА*

(Московский государственный университет, Москва)

Д5.7. Мутантные формы люциферазы светляков с пониженной рН-чув-
ствительностью спектров биолюминесценции

Обед 13 : 00 – 14 : 00

Продолжение секции 5

Моделирование в системах люминесцентных белков

Председатели: *Александр НЕМУХИН, Б. ГРИГОРЕНКО*
И. ПОЛЯКОВ, К. БРАВАЯ, А. БОЧЕНКОВА, А. САВИЦКИЙ

14 : 30 – 15 : 00 (30 мин.) *Александр НЕМУХИН, Б. ГРИГОРЕНКО, И. ПОЛЯКОВ, К. БРАВАЯ, А. БОЧЕНКОВА, А. САВИЦКИЙ*
(Московский государственный университет, Москва)
Д5.8. Моделирование строения, спектров и свойств флуоресцентных и фоторецепторных белков

15 : 00 – 15 : 20 (20 мин.) *Феликс ТОМИЛИН, Л. АНТИПИНА, Е. ВЫСОЦКИЙ, С. ОВЧИННИКОВ*
(Институт физики СО РАН Красноярск)
Д5.9. Квантово-химическое моделирование процесса флуоресценции кальций-разряженного обелина

15 : 20 – 15 : 40 (20 мин) *Надежда КУДРЯШОВА, Е. НЕМЦЕВА, Н. БЕЛОГУРОВА*
(Институт биофизики СО РАН, Красноярск)
Д5.10. Трансформация энергии в биолюминесцентных реакциях

15 : 40 – 15 : 55 (15 мин.) *Игорь ПОЛЯКОВ, Б. ГРИГОРЕНКО, А. МОСКОВСКИЙ, А. НЕМУХИН*
(Московский государственный университет, Москва)
Д5.11. Моделирование цис-транс изомеризации хромофора зеленого флуоресцентного белка

15 : 55 – 16 : 10 (15 мин.) *Екатерина ХРАМЕЕВА, В. ДРУЦА, Е. ВРЖЕЩ, Д. ДМИТРИЕНКО, П. ВРЖЕЩ*
(Московский государственный университет, Москва)
Д5.12. Получение мутантов флуоресцентного белка mRFP1 и расчет их структур методами молекулярного моделирования

Перерыв 16 : 10 – 16 : 30

Люминесцентные биосенсорные системы

Председатели: *Дмитрий ЧУДАКОВ, Д. ЩЕРБО*
И. ПОЛЯКОВ, А. БОЧЕНКОВА, А. САВИЦКИЙ

16 : 30 – 17 : 00 (30 мин.) *Дмитрий ЧУДАКОВ, Д. ЩЕРБО*
(Институт биоорганической химии РАН, Москва)
Д5.13. Новые красные и дальне-красные флуоресцентные белки

17 : 00 – 17 : 30 (30 мин.) Всеволод БЕЛОУСОВ

(Институт биоорганической химии РАН, Москва)

Д5.14. Пероксид водорода как вторичный мессенджер: исследование с помощью генетически кодируемого флуоресцентного индикатора

17 : 30 – 17 : 50 (20 мин.) Екатерина СЛОБОЖАНИНА, Н. КОЗЛОВА, Л. КАСЬКО

(ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск)

Д5.15. Люминесценция амниотической жидкости. Диагностическое значение

17 : 50 – 18 : 10 (20 мин.) Людмила ФРАНК, В. БОРИСОВА

(Институт биофизики СО РАН, Красноярск)

Д5.16. Целенгазин-зависимые белки для биолюминесцентного микроанализа Γ *hffcb*

18 : 10 – 19 : 00 Стендовая сессия 5

С5.1. Дмитрий РОЩУПКИН, М. МУРИНА

Изучение квантовомеханическими методами образования хромофора в зеленом флуоресцентном белке

С5.2. Ляйсан АРСЛАНБАЕВА, И. МЕЕРОВИЧ, А. САВИЦКИЙ

Получение опухолевой клеточной меланомы линии W^{ad} стабильно экспрессирующей красный флуоресцентный белок TurboRFP в условиях Γ *hfla Uf hffcb*

С5.3. Надежда БЕЛОГУРОВА, Н. КУДРЯШЕВА, Р. АЛИЕВА

Экспериментальная проверка гипотезы об активности высших электронно-возбужденных состояний в биолюминесценции кишечнорастворимых

С5.4. Алексей БОГДАНОВ, Александр МИШИН, Константин ЛУКЬЯНОВ

Окислительная фотоконверсия зелёного флуоресцентного белка

С5.5. Александр МИШИН, Федор СУБАХ, Владислав ВЕРХУША, Константин ЛУКЬЯНОВ

Первый вариант GFP медузы $3\text{W}^{\text{gad}}\text{hUadS}$ с пиком эмиссии флуоресценции в красной области спектра

С5.6. Александр РУСАНОВ, Татьяна ИВАШИНА, Александр САВИЦКИЙ

Роль 178 положения в формировании хромофора KFP

С5.7. Наталья САФРОНОВА, Всеволод БЕЛОУСОВ

Создание генетически кодируемого флуоресцентного индикатора для внутриклеточной детекции оксида азота

C5.8. Лицзюань ЧЖАН, Надежда ГУРСКАЯ, Елена КОПАНЦЕВА, Константи ЛУКБЯНОВ

Обратимо фотоконвертируемый мономерный красный флуоресцентный белок

C5.9. Ю.А. МОДЕСТОВА, Г.Ю. ЛОМАКИНА, Н.Н. УГАРОВА

Роль остатков цистеина люциферазы светляков >Ž_ [YdM₂LS в функционировании фермента

Ужин 19 : 00 – 20 : 00

Среда, 11 июня

Параллельное заседание

Секция 4: Фотодинамическая терапия, фотофизика и фотохимия биомолекул

Председатель: *Вадим Решетов, Татьяна Зорина, Иван Хлудеев*

14 : 30 – 14 : 50 (20 мин.) *Вадим РЕШЕТОВ, Татьяна ЗОРИНА, Иван ХЛУДЕЕВ, Михаил АРТЕМЬЕВ, Владимир ЗОРИН*

(Белорусский государственный университет, Минск)

Д4.1. Анализ процессов распределения флуоресцирующих полупроводниковых нанокристаллов в крови человека

14 : 50 – 15 : 05 (15 мин.) *Ольга Д. БЕКАСОВА*

(Институт биохимии РАН, Москва)

Д4.2. Наночастицы 5VE и 3Y полученные в водном растворе D-фикоэритрина: оптические, фотохимические свойства, перспективы применения

15 : 05 – 15 : 20 (15 мин.) *Виолета ПУРЦХВАНИДЗЕ, Александр РАДАЕВ, Евгений СТРАНАДКО*

(Поликлиника №84 ЮЗАО, Москва)

Д4.3 Амбулаторная фотодинамическая терапия рака кожи с хлориновыми производными

15 : 20 – 15 : 35 (15 мин.) *Марина ШИРМАНОВА, Елена ЗАГАЙНОВА, Ирина БАЛАЛАЕВА, Марина СИРОТКИНА, Анна ОРЛОВА, Михаил КЛЕШНИН*

(Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород)

Д4.4. Фотосенсибилизаторы как опухолевые маркеры для визуализации экспериментальных новообразований методом диффузионной флуоресцентной томографии

15 : 35 – 15 : 50 (15 мин.) *Дмитрий С. КОЧЕТКОВ, С. Л. СОСНОВСКИЙ, В.П.ЗОРИН, Л.Н.БОЛОТИНА*

(Белорусский государственный университет, Минск)

Д4.5. Фотоиндуцированное тушение флуоресценции липосомальных форм порфиринов в липидных везикулах и его использование при анализе фармакокинетики

15 : 50 – 16 : 05 (15 мин.) *Марина НАКВАСИНА, Олеся ЛИДОХОВА, Мария ТРУБИЦЫНА, Людмила Попова, Валерий АРТЮХОВ*

(Воронежский государственный университет, Воронеж)

Д4.6. УФ-свет и активные формы кислорода как модуляторы структурно-функционального состояния лимфоцитов человека

16 : 05 – 16 : 20 (15 мин.) *Сергей К. ПИРУТИН, В.Б. ТУРОВЕЦКИЙ, Ю.Б. КУДРЯШОВ*

(ИТЭБ РАН, Пушкино)

Д4.7. Влияние ионов водорода на фоточувствительность мембран перитонеальных макрофагов

Перерыв 16 : 20 – 16 : 40

Продолжение секции 4

Председатель: *Эльза Валентиновна*

16 : 40 – 16 : 55 (15 мин.) *Ольга В. НЕВРОВА, ЛОБАНОВ А.В., КОМИССАРОВ Г.Г.*

(Институт химической физики РАН, Москва)

Д4.8. Фоторазложение пероксида водорода хлорофиллом и металлокомплексами порфиринов

16 : 55 – 17 : 10 (15 мин.) *Александр ДОНЦОВ, Виктория ЛАПИНА*

(Институт биохимической физики РАН, Москва)

Д4.9. Эффект УФ-индуцированной фотодеградации на антиоксидантные свойства меланинов

17 : 10 – 17 : 25 (15 мин) *Юлия Л. ВЕЧТОМОВА, Т.А. ТЕЛЕГИНА, М.П. КОЛЕСНИКОВ, А.В. УМРИХИНА, Е.А.СВИРИДОВ, М.С. КРИЦКИЙ*

(Институт биохимии РАН, Москва)

Д4.10. Фотохимия фолиевой кислоты и ее коферментных форм

17 : 25 – 17 : 40 (15 мин.) *Таясия А. ТЕЛЕГИНА, М.П. КОЛЕСНИКОВ, М.С. КРИЦКИЙ*

(Институт биохимии РАН, Москва)

Д5.11. Фотохимические модели предбиологического фосфорилирования

Ужин 19 : 00 – 20 : 00

Четверг, 12 июня

Параллельное заседание

Секция 3: Фоторецепция

9 : 30 – 10 : 10 (40 мин.) *Ольга СМИТИЕНКО, И.В. ШЕЛАЕВ, Ф.Е. ГОСТЕВ, Т.Б. ФЕЛЬДМАН, В.А. НАДТОЧЕНКО. О.М. САРКИСОВ, М.А. ОСТРОВСКИЙ*
(Институт биохимической физики РАН, Москва)

ДЗ.1. Фемтосекундная динамика первичной фотореакции родопсина в зависимости от длины волны возбуждения в диапазоне 500–560 нм

10 : 10 – 10 : 50 (40 мин.) *Татьяна Б. ФЕЛЬДМАН*

(Институт биохимической физики РАН, Москва)

ДЗ.2. Особенности фотопревращения родопсина на ранних стадиях фотоллиза

10 : 50 – 11 : 30 (40 мин.) *Jon HUGHES*

(Justus Liebig University Giessen, Germany)

ДЗ.3. The structure of a complete phytochrome sensory module in the Pr ground state

Перерыв 11 : 30 – 11 : 50

11 : 50 – 12 : 30 (40 мин.) *Людмила В. ДУБОВСКАЯ, И. ВОЛОТОВСКИЙ*

(Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск)

ДЗ.4. Циклический гуанозин-3',5'-монофосфат – ключевой элемент светового и фитогормонального сигнального кросстока в растениях

12 : 30 – 13 : 00 (30 мин.) *Дмитрий А. ЛОСЬ*

(Институт физиологии растений РАН, Москва)

ДЗ.5. Сигнальные системы цианобактерий

13 : 00 – 13 : 30 (30 мин.) *М.Г. РАХИМБЕРДИЕВА, И.В. ЕЛАНСКАЯ, Н.В. КАРАПЕТЯН*

(Институт биохимии РАН, Москва)

ДЗ.8. Фотозащита у цианобактерий: ксантофилл-белковый комплекс как фоторецептор и медиатор диссипации избыточной энергии

Обед 14 : 00 – 15 : 00

15 : 00 – 15 : 40 (40 мин.) *Михаил С. КРИЦКИЙ*

(Институт биохимии РАН, Россия)

ДЗ.6. Фотохимия коферментов и проблема эволюционного отбора фотосенсорных хромофоров в белках

15 : 40 – 16 : 20 (40 мин.) *Татьяна ДОМРАЧЕВА, ILME SCHLICHTING, Б. ГРИГОРЕНКО, А. НЕМУХИН*

(Max Planck Institute for Medical Research, Heidelberg, Germany)
ДЗ.7. Фотохимия флавинов в рецепторах голубого света

Перерыв 16 : 20– 16 : 40

16 : 40 Стендовая сессия 3

Обсуждение стендовых сообщений

17 : 00 – 17 : 10 *Мария ХРЕНОВА, Анастасия БОЧЕНКОВА, Александр ГРАНОВСКИЙ, Сергей КОНЮХОВ, Белла ГРИГОРЕНКО, Александр НЕМУХИН*

СЗ.1. Моделирование структуры и спектров батородопсина – первичного интермедиата в цикле зрительной рецепции

17 : 10 – 17 : 20 *Гариф АКЧУРИН, Владимир МАКСИМОВ, Оксана НАУМОВА*

СЗ.2. Определение ретиальной остроты зрения человека и низко-когерентная оптическая томография фовеальной пространственной организации фоторецепторных клеток

17 : 20 – 17 : 30 *Iryna A. KRYVULIA, Elena M. KABACHEVSKAYA, Georgy V. LIAKHNOVICH, Igor D. VOLOTOVSKI*

СЗ.3. Photoregulation of the expression of phospholipase D gene in oat seedlings

17 : 30 – 17 : 40 *Валерий Ю. ЛЮБИМОВ, В.Д. КРЕСЛАВСКИЙ*

СЗ.4. Возможная роль фитохрома в регуляции уровня перекиси водорода и антиоксидантного потенциала листьев этиолированных проростков пшеницы

17 : 40 – 17 : 50 *В.Н. ПОПОВ, А.Т. ЕПРИНЦЕВ, Дмитрий ФЕДОРИН, Н.А. КАРПЕЧЕНКО*

СЗ.5. Роль фитохромной и криптохромной систем в регуляции активности сукцинатдегидрогеназы в листьях кукурузы

17 : 50 – 18 : 00 *Галина В. КОЧЕТОВА, С.В. КОНСТАНТИНОВА, У.Б. БАШТАНОВ*

СЗ.6. Двухкомпонентная система фитохромной регуляции устьичных движений

18 : 00 – 18 : 10 *Лариса А. КОППЕЛЬ, Е.А. ОРЕХОВА, В.А. СИНЕЦЁКОВ*

СЗ.7. Влияние неспецифических ингибиторов протеин фосфатаз на состояние пулов фитохрома O^2 в корнях кукурузы LW_SfeL .

Ужин 19 : 00 – 20 : 00

Концерт 20 : 00

Четверг, 12 июня

Параллельное заседание

Секция 4: Фотодинамическая терапия, фотофизика и фотохимия биомолекул (Продолжение)

Молекулярные механизмы действия оптического излучения

Председатель: *Д. З. З. Ю. П. У. А. Б.*

9 : 00 – 9 : 30 (30 мин.) *Александр А. КРАСНОВСКИЙ*

(Институт биохимии РАН, Москва)

Д4.12. Фотохимическая активность кислорода при его прямом лазерном возбуждении в органических и водных средах. Применение к анализу ИК полос поглощения O₂

9 : 30 – 10 : 00 (30 мин.) *Анатолий Н. ОСИПОВ, Г.О. СТЕПАНОВ, Ю.А. ВЛАДИМИРОВ*

(Российский государственный медицинский университет, Москва)

Д4.13. Фотохимические свойства нитрозильных комплексов гемопротенинов

10 : 00 – 10 : 30 (30 мин.) *Борис М. ДЖАГАРОВ, С. В. ЛЕПЕШКЕВИЧ*

(Институт физики НАН Беларуси, Минск)

Д4.14. Фотодиссоциация комплексов гемоглобина и миоглобина с малыми лигандами O₂, CO, NO

10 : 30 – 11 : 00 (30 мин.) *Юрий А. ВЛАДИМИРОВ*

(Московский государственный университет, Москва)

Д5.15. Биостимулирующее действие лазерного излучения: фотохимические реакции или фототермический эффект?

11 : 00 – 11 : 30 (30 мин.) *Андрей Ф. МИРОНОВ*

(Московская государственная академия тонкой химической технологии, Москва)

Д4.16. Синтез и спектральные свойства супрамолекулярных структур на основе природных порфиринов

Перерыв 11 : 30– 11 : 50

Председатель: *З. З. А. С. В. А. У. У.*

11 : 50 – 12 : 20 (30 мин.) *Владимир МАЖУЛЬ, Екатерина ЗАЙЦЕВА,*

Александр ТИМОШЕНКО, Инесса ГАЛЕЦ, Татьяна ЧЕРНОВЕЦ

(Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск)

Д4.17. Триптофановая фосфоресценция лектинов при комнатной температуре

12 : 20 – 12 : 35 (15 мин.) *Александр ПОТАПЕНКО, Елена КОЖИНОВА, Татьяна ШМИГОЛЬ, Андрей ТИХОМИРОВ, Михаил МАЛАХОВ*
(Российский государственный медицинский университет, Москва)
Д4.18. Агрегация мероцианина 540 (МЦ540) приводит к повышению фототабильности красителя

12 : 35 – 12 : 50 (15 мин.) *Наталья БРЯНЦЕВА, Ирина СОКОЛОВА, Антонина ЦЫРЕНЖАПОВА, Владимир ХИЛЯ, Яна ГАРАЗД*
(Томский государственный университет, Томск)
Д4.19. Свойства триплетных состояний новых сенсibilизаторов на основе кумаринов

12 : 50 – 13 : 05 (15 мин.) *Марина Ю. ЛОГИНОВА, В.Э. ЗАГИДУЛЛИН, Е.В. РОСТОВЦЕВА, Т.Б. ФЕЛЬДМАН, В.З. ПАЩЕНКО, А.Б. РУБИН, М.А. ОСТРОВСКИЙ*
(Институт биохимической физики РАН, Москва)
Д4.20. Полностью-транс ретиналь и продукты его превращения как фотосенсibilизаторы в механизме повреждающего действия света на молекулу зрительного пигмента родопсина в фоторецепторной мембране зрительной клетки

13 : 05 – 13 : 20 (15 мин.) *Александр ВОРОБЕЙ, Павел ВОРОБЕЙ*
(Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск)
Д4.21. Фоторазрушение фолатов

Обед 14:00– 15:00

Секция 4: Фотодинамическая терапия, фотофизика и фотохимия биомолекул (Продолжение)

Клеточные механизмы действия видимого и УФ излучения и фотодинамическая терапия

Председатель: *Александр Савва*

15 : 30 – 15 : 50 (20 мин.) *Евгений Ф. СТРАНАДКО*
(ФГУ “Государственный научный центр лазерной медицины”, Москва)
Д4.22. Оптимизация параметров фотодинамической терапии злокачественных опухолей с фотосенсibilизаторами первого и второго поколения

15 : 50 – 16 : 10 (20 мин.) *Валерий АРТЮХОВ, Марина НАКВАСИНА, Олеся ЛИДОХОВА, Мария ТРУБИЦЫНА*
(Воронежский государственный университет, Воронеж)
Д4.23. Исследование механизмов апоптоза лимфоцитов человека, индуцированного УФ-светом

16 : 10 – 16 : 30 (20 мин.) *Алла КЯГОВА, Людмила КОЗЫРЬ, Галина МАН-*

СУРОВА, Зоя МОШНИНА, Гелий ПОНОМАРЕВ, Александр ПОТАПЕНКО
(Российский Государственный Медицинский Университет, Москва)
Д4.24. Продукты фотоокисления фотосенсибилизаторов обладают суп-
рессорным действием на Т-клеточный иммунный ответ Γ *h/ha*

16 : 30 – 16 : 50 (20 мин.) Анатолий УЗДЕНСКИЙ
(Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону)

Д4.25. Фотодинамическое повреждение нейронов и глиальных клеток:
сигнальные механизмы

16 : 50 – 17 : 10 (20 мин.) Станислав ЗАХАРОВ, Николай ГОНЧАРОВ,
Александр АЛЕХИН, Сергей КАЦАЛАП
(Физический институт РАН, Москва)

Д4.26. Фоторецепторные свойства молекулярного кислорода, раство-
ренного в плазме крови

17 : 30 Стендовая сессия 4

С4.1. Георгий АКЧУРИН, Гариф АКЧУРИН, Ирина МАКСИМОВА, Георгий
СЕЛИВЕРСТОВ, Георгий ТЕРЕНТЬЮК, Борис ХЛЕБЦОВ, Николай ХЛЕБЦОВ,
Валерий ТУЧИН

Инфракрасный лазерный фототермолиз и фотодинамическая инактивация
клеток при взаимодействии излучения с фотосенсибилизаторами и плаз-
монно-резонансными наночастицами

С4.2. Людмила БУНЕГИНА, Анна ОРЛОВА, Светлана ЕРМОЛЬЕВА, Елена
ЗАГАЙНОВА

Исследование накопления 5-алк индуцированных эндогенных порфири-
нов бактериальными клетками Γ *h/ftch*

С4.3. Ирина ВАСИЛЕВИЧ, Елена ЛОБАНОК, Сергей ПИНЧУК

Влияние ионов железа на состояние митохондрий при фотодинамичес-
ком действии эндогенных порфиринов

С4.4. С.М. ДУБОВА, В.Г. АРТЮХОВ, О.В. ПУТИНЦЕВА

Влияние УФ-облучения на экспрессию LFA-1 молекул Т-лимфоцитами
крови доноров

С4.5. Е. А. КАЛАЕВА, О. В. ПУТИНЦЕВА, В. Г. АРТЮХОВ

Физико-химические свойства оксигемоглобина человека, модифициро-
ванного воздействием препаратов – доноров оксида азота и УФ-излучения

С4.6. Оксана М. КОЖОКИНА, Т. А. КОВАЛЕВА, М. Г. ХОЛЯВКА

Исследование активного центра некоторых гидролаз в присутствии фо-
тосенсибилизатора – метиленового голубого

С4.7. Константин В. ЛАЗНЕВ

Устойчивость клеток крови к фотодинамическому воздействию как воз-

можный критерий окислительного стресса

С4.8. Андрей ЛОБАНОВ, Анатолий УЗДЕНСКИЙ

Нейротрофическая модуляция фотодинамического повреждения нейронов и глиальных клеток

С4.9. Елена ЛОБАНОВА, Наталия ШУКАНОВА, Ирина ВАСИЛЕВИЧ

Влияние глутатиона на фотосенсибилизированные АЛК-индуцированными порфиринами повреждения плазматических мембран лимфоидных клеток

С4.10. Юлия ЛЫСЕНКО, Валерий АРТЮХОВ, Вера ВИРЮТИНА, Татьяна ШВЫРЕВА

Фотосенсибилизированные метиленовым голубым модификации биомакромолекул некоторых клеток крови и асцитной карциномы Эрлиха в условиях различного микроокружения

С4.11. Алина ПАШКОВСКАЯ, Елена КОТОВА, Владимир МАЙЗЛИШ, Юрий АНТОНЕНКО

Фотосенсибилизированное повреждение ионных каналов грамицидина А в бислоистой липидной мембране в присутствии катионных металлофталоцианинов: роль связывания фотосенсибилизатора с мембраной

С4.12. Сергей ПИНЧУК, Александр ВОРОБЕЙ

Фотосенсибилизированное порфиринами подавление прорастания грибных спор

С4.13. О.В. ПУТИНЦЕВА, В.Г. АРТЮХОВ, В.А. ВДОВИНА, И.А. КОЛТАКОВ

Уровень экспрессии CD8 рецепторов на поверхности Т-лимфоцитов крови человека, индуцированной УФ-излучением

С4.14. Наталья РОМАНЕНКО, Анатолий УЗДЕНСКИЙ

Противоапоптотное действие глутамата при фотодинамическом повреждении глиальных клеток

С4.15. Григорий ФЕДОРЕНКО, Анатолий УЗДЕНСКИЙ

Динамика ультраструктурных изменений в механорецепторном нейроне рака, вызванных фотодинамическим воздействием

С4.16. Анна ШУМАРИНА, Наталья БЕЛЕНИКИНА, Марина СТРАХОВСКАЯ, Григорий ФРАЙКИН

Фотодинамическая инактивация дрожжевых клеток с участием эндогенных и экзогенных сенсibilизаторов

Ужин 19 : 00 – 20 : 00

Концерт 20 : 00

Пятница, 13 июня

Секция 6: Современные оптические методы в фотобиологии (Продолжение)

Председатели: *Д.А.Урбанович, В.А.Савицкий, Ю.И.Лавров, Я.А.Савицкий, Э.А.Савицкий, А.А.Савицкий*

9 : 00 – 9 : 20 (20 мин.) *Олег М. САРКИСОВ*

(Институт химической физики РАН, Москва)

Дб.11. Фемтосекундный манипулятор-скальпель и его применение

9 : 20 – 9 : 40 (20 мин.) *Ю.А. ГРЫЗУНОВ, А.А. КОМАР, Т.И. СЫРЕЙЩИКОВА, Н.В. СМОЛИНА, Г.Е. ДОБРЕЦОВ, Э.Ю. МИСИОНЖНИК, Н.М. МАКСИМОВА, М.Г. УЗБЕКОВ*

(ФИАН им. П.Н. Лебедева, ФГУ НИИ физико-химической медицины Росздрава, Москва)

Дб.12. Разработка новых подходов для индивидуального прогноза эффективности терапии депрессий на основе пикосекундной флуоресцентной спектроскопии

9 : 40 – 10 : 00 (20 мин.) *А.В. КРАЙСКИЙ, В.А. ПОСТНИКОВ, В.В. ДЕНИСКИН, Т.Т. СУЛТАНОВ, В.Е. ТИХОНОВ, А.В. ХАМИДУЛИН*

(ФГУ НИИ физико-химической медицины Росздрава, Москва)

Дб.13. Голографические датчики на основе гидрогелей для количественного определения компонентов в биологических жидкостях

10 : 00 – 10 : 20 (20 мин.) *А.В. НАЩЕКИН, К.К. ТУРОВЕРОВ, О.А. УСОВ, П.Н. БРУНКОВ, А.И. СИДОРОВ*

(Физико-технический институт РАН, Санкт-Петербург)

Дб.14. Высокоэффективные биосенсоры на основе поверхностных плазмонных наноструктур для идентификация биохимических реакций

10 : 20 – 10 : 40 (20 мин.) *В.А. КУЗЬМИН, Н.Н. ВЕЙКО, О.А. РОГИНКО, О.А. КОЗДОБА, Т.Д. НЕКИПЕЛОВА, А.М. ВИНОГРАДОВ, В.В. ВОЛНУХИН, А.Л. ЖУЗЕ, А.А. ЮДИН, А.И. СПЕРАНСКИЙ*

(Институт биохимической физики РАН, Москва)

Дб.15. Спектрально-кинетические методы исследования комплексов красителей и гетероциклических соединений с биомакромолекулами

10 : 40 – 11 : 00 (20 мин.) *Сергей М. ДЕЕВ*

(Институт биоорганической химии РАН, Москва)

Дб.16. Стабильная линия клеток аденокарциномы яичника человека, флуоресцирующая в дальней красной области

11 : 00 – 11 : 20 (20 мин.) *Ирина БАЛАЛАЕВА, Анна БРИЛКИНА, Марина ШИРМАНОВА, Татьяна ЗДОБНОВА, Эвелина ЭДЕЛЬВЕЙС, Марина СИРОТКИНА, Олег СТРЕМОВСКИЙ, Сергей ДЕЕВ, Анна ОРЛОВА*

(Нижегородский государственный университет, Нижний Новгород)
Д6.17. Прижизненная флуоресцентная визуализация опухолей с использованием полупроводниковых нанокристаллов

Перерыв 11 : 20 – 11 : 30

Продолжение секции 6

Председатели: *Д аU² BС^x Q⁶ ~ YC^U P Ua⁰
2 Y^x U⁰ B⁰ 3 U^c C^U a^U Q⁶ A^x a⁰ O*

11 : 30 – 11 : 50 (20 мин.) *Наталья ШАХОВА, Ирина БАЛАЛАЕВА, Валентин ГЕЛИКОНОВ, Григорий ГЕЛИКОНОВ, Елена ЗАГАЙНОВА, Владислав КАМЕНСКИЙ, Анна ОРЛОВА, Екатерина СЕРГЕЕВА, Илья ТУРЧИН*
(Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород)
Д6.18. Разномасштабный оптический биоимиджинг

11 : 50 – 12 : 10 (20 мин.) *Ирина МЕЕРОВИЧ, Ляйсан АРСЛАНБАЕВА, Илья ТУРЧИН, Анна ОРЛОВА, Марина ШИРМАНОВА, Александр САВИЦКИЙ*
(Институт биохимии РАН, Москва)

Д6.19. Прижизненный мониторинг флуоресцирующих опухолей лабораторных животных методами ДФТ и флуоресцентной спектроскопии

12 : 10 – 12 : 30 (20 мин) *Анна ОРЛОВА, Владислав КАМЕНСКИЙ, Анна МАСЛЕННИКОВА, Владимир ПЛЕХАНОВ, Герман ГОЛУБЯТНОКОВ, Наталья ШАХОВА, Михаил КЛЕШНИН, Илья ТУРЧИН*
(Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород)

Д6.20. Исследование кислородного статуса тканей молочной железы методом оптической диффузионной томографии в норме и при патологии

12 : 30 – 12 : 50 (20 мин.) *К.В. АНОХИН, А.А. ЛАЗУТКИН, О.И. ЕФИМОВА, Д.В. БЕЗРЯДНОВ, С.А. ЧЕХОВ*
(Институт нормальной физиологии РАНН, Москва)

Д6.21. Новые методы молекулярного биоимиджинга в нервной системе

12 : 50 – 13 : 10 (20 мин.) *Андрей МОРОЗОВ, Илья ТУРЧИН, Владислав КАМЕНСКИЙ, Константин АНОХИН*
(Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород)

Д6.22. Флуоресцентная ультрамикроскопия для исследования просветленных биологических тканей

13 : 10 – 13 : 30 (20 мин.) *Владимир ВОДЕНЕЕВ, Елена АКИНЧИЦ, Ирина БАЛАЛАЕВА, Роман МАМОНОВ, Анна ОРЛОВА*

(Нижегородский государственный университет, Нижний Новгород)
Д6.23. Конфокальная и оптическая когерентная микроскопия для изучения потенциалов возбуждения у растений

13 : 30 – 13 : 50 (20 мин.) Н.Н. БУЛГАКОВА, Е.Г. НОВИКОВА, И.А. АПО-
ЛИХИНА, Е.Д. ДЕНИСОВА, О.И. ТРУШИНА, О.С. БАЛАХОНЦЕВА, К.А. ВЕРЕ-
ЩАГИН, В.В. СМИРНОВ

(Институт общей физики РАН, Москва)

**Д6.24. Лазер-индуцированная аутофлуоресценция в диагностике пред-
рака и раннего рака**

Закрытие V Съезда фотобиологов

Отъезд участников

Session I:

Primary Processes of Photosynthesis

Abstracts

T1.1

THE ROLE OF THE H-BOND TO THE A_{1A} QUINONES IN PHOTOSYSTEM I

John H. GOLBECK

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Department of Chemistry,
The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802 USA
E-mail: jhg5@psu.edu

In this talk, I will focus on the L722_{PsaA} residue involved in the formation of the single hydrogen bond to the A_{1A} phylloquinone in Photosystem I. I will present the transient EPR studies of a variant in which Leu722_{PsaA} has been replaced by Trp722_{PsaA}. The rationale behind this replacement was that the bulky Trp residue may sterically prevent the quinone from binding in its site, thereby precluding A-side electron transfer. Contrary to expectation, the binding pockets were filled with phylloquinone although the hydrogen bond strength was considerably reduced as shown by the weaker $-\text{CH}_3$ hyperfine coupling. This led to a lower reduction potential for the A_{1A} quinone, and a larger free energy change between F_X and A_{1A}' which resulted in a ~10-fold acceleration in the rate of electron transfer. The A_{1A} quinone, however, undergoes facile double reduction with sodium dithionite, which serves to eliminate the A-branch as a pathway for electron transfer. The remaining transient EPR signal is only 25 % the intensity of the wild-type, but shows an altered spectrum of the polarized radical pair P₇₀₀⁺ A₁⁻, which is similar to that expected by numerical simulation for B-branch electron transfer. I propose that the primary purpose of the H-bond is not to poise the redox potential of the quinone, but to tie up its C1 carbonyl group so as to prevent double reduction/protonation during the normal course of light-induced electron transfer.

T1.2

**PRIMARY LIGHT-ENERGY CONVERSION IN TETRAMERIC
CHLOROPHYLL STRUCTURE OF PHOTOSYSTEM II AND BACTERIAL
REACTION CENTERS**

**Vladimir A. SHUVALOV, Ravil A. KHATYPOV, Anton A. KHMELNITSKY,
Maria M. LEONOVA, Anatolii Ya. SHKUROPATOV
and Ludmila G. VASILIEVA**

Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino,
Moscow Region, Russia
E-mail: shuvalov@issp.serpukhov.su

The Stark effect measurements on PSII reaction centers revealed an increased dipole moment for the transition at ~730 nm. It was found (Heber and Shuvalov, 2005) that two fluorescent bands at 685 and 720 nm are observed in different organisms. These two forms are registered in the action spectrum of Q_A photoreduction. Similar results were obtained in core-complexes of PSII at low temperature. In all cases the far-red absorption and emission can be interpreted as indication of the state with charge transfer character in which the chlorophyll monomer takes place as an electron donor.

The role of (bacterio)chlorophyll monomers (B_A and B_B) in bacterial RCs can be revealed by different mutations of axial ligand for Mg central atoms. RCs with mutation replacement of histidin L153 by tyrosine or leucine and of histidin M182 by leucine (double mutant) are not stable in isolated state. They were studied in antennaless membrane by different kind of spectroscopy including one with femtosecond time resolution. It was found that a single mutation (HL153Y) is accompanied by a loss of B_A molecule with absorption near 802 nm and by 14-fold decrease of photochemical activity measured with ms time resolution. The lifetime of P_{870}^* is increased up to ~200 ps in agreement of very low rate of the electron transfer to A-branch. In double mutant the B_A is lost and B_B is replaced by bacteriopheophytin A_B with the absence of any absorption near 800 nm. Fs measurements have revealed the electron transfer to B-branch with a time constant of ~2 ps. These results are discussed in terms of obligatory role of B_A and A_B molecules located near P for efficient electron transfer from P^* .

FEMTOSECOND PRIMARY CHARGE SEPARATION IN PHOTOSYSTEM I

**Alexey SEMENOV¹, Ivan SHELAEV², Fedor GOSTEV², Mahir MAMEDOV¹,
Oleg SARKISOV², Victor NADTOCHENKO³ and Vladimir SHUVALOV¹**

¹A.N. Belozersky Institute of Physical-Chemical Biology, Moscow State University
E-mail: semenov@genebee.msu.ru; Fax: +7-495-9393181

²N.N. Semenov Institute of Chemical Physics RAS,

³Institute of Problems of Chemical Physics RAS

The energy and electron transfer in photosystem I (PS I) has been studied by femtosecond pump-probe absorption spectroscopy technique under different excitation conditions. The excitations were performed in “open” (reduced) and “closed” (oxidized) PS I reaction center (RC) by 20 fs laser pulses centered at 700 nm and 720 nm. The suggested experimental approach affords to distinguish between spectral and kinetic features of photo-excited chlorophyll (Chl) molecules in the light harvesting antenna complex and formation of ion-radical pairs in RC. It was shown that selective excitation of the special pair P700 ($\lambda = 720$ nm) leads to the appearance of the spectra of $P700^+A_0^-$ state (main bleachings at 688 and 705 nm) within several tens of femtoseconds. The preferential excitation of antenna Chl at 700 nm results in formation of much more developed bleaching at 685 nm that masks the smaller 705 nm bleaching band, which is characteristic of $P700^+$. In this case the formation of primary radical pair $P700^+A_0^-$ (risetime ~ 5 ps) is limited by excitation energy transfer inside light-harvesting antenna complex. The formation of the secondary radical pair $P700^+A_1^-$ (where A_1 is the molecule of phylloquinone) occurs in both cases within ~ 25 ps. The subtraction of kinetic spectra of the closed RC (state $P700^+$ prepared by additional illumination) from that of the open RC reveals the pure spectrum of the $P700^+A_0^-$ ion-radical pair without contamination from the excited antenna Chl molecules.

On the basis of the obtained results and the quantum-chemical and electrostatic calculations we conclude that:

1. The primary donor P700 is the dimer of Chl molecules *Chl1A/Chl1B* (where A and B represent cofactors attached to *PsaA* and *PsaB* subunits), while the primary acceptor A_0 is more loosely bound dimer of Chl molecules *Chl2A/Chl3A* (or *Chl2B/3B*);
2. Selective excitation of P700 results in formation of the primary radical pair $P700^+A_0^-$ (the risetime is comparable to the duration of the laser pulse of ~ 20 fs);
3. Under preferential excitation of the antenna Chl, the rate-limiting step of the primary electron transfer is the picosecond transfer of excitation energy to P700.

T1.4

POSSIBLE ROLE OF BICARBONATE IN THE PHOTOSYNTHETIC WATER OXIDATION

Vyacheslav V. KLIMOV

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

E-mail: klimov@issp.serpukhov.su; FAX: +7-496-7330532

It is known that bicarbonate (BC) facilitates electron transfer between the primary and secondary electron acceptors, Q_A and Q_B , in formate-inhibited photosystem II (PS II); the non-heme Fe between Q_A and Q_B plays an essential role in BC binding. Strong evidence for BC requirement within the water-oxidizing complex (WOC) (both O_2 -evolving and assembling from apo-WOC and Mn(II)), of PSII is presented. The following explanations for the involvement of BC in the events within the WOC are considered: 1) BC facilitates re-assembly of the WOC from apo-WOC and Mn(II); 2) BC is a constituent of the WOC essential for its function and stability; it may serve as a direct ligand to the inorganic core of the WOC modifying the redox properties of Mn; 3) BC is an easily accessible base (with an appropriate pK) involved in the removal of protons released during water oxidation. Comparative studies of electrochemical and functional properties of complexes of Mn(II) and Mn(III) with BC and other carboxylates (formate and acetate) show that the unique capability of BC to initiate the assembly of the tetramanganese cluster of the WOC from Mn(II) and apo-WOC-PSII can be attributed to formation of electroneutral, easily oxidizable Mn/BC-complexes that serve as building blocks for the WOC.

T1.5

**ELECTROGENIC REACTIONS INVOLVING PHOTOSYSTEM II
TURNOVER**

Mahir MAMEDOV

A.N. Belozersky Institute of Physical-Chemical Biology, Moscow State University
119992 Moscow, Leninskie gory, Russia
E-mail: mamedov@genebee.msu.su ; Fax: (495) 939 3181

Photosystem II (PS II) is the light-driven oxido-reductase integrally imbedded in the thylakoid membranes of cyanobacteria, algae and green plants that catalyzes the oxidation of water into molecular O₂ as a waste product and reduction of plastoquinone to plastoquinol.

The goal of this report is to summarize the present state of knowledge of the molecular mechanism of membrane potential generation involving PS II turnover. We draw upon recent high-resolution structural evidence and voltage changes related to electron transfer both at the reducing and donor sides of PS II. Finally we present the data regarding to dielectric properties of various domains within PS II complex.

**STRUCTURAL CHANGES ACCOMPANYING ELECTRON TRANSFER
FROM THE PRIMARY TO THE SECONDARY ELECTRON ACCEPTOR
OF BACTERIAL REACTION CENTERS****Irina KLENINA, Aleksandr KUZMIN, Tatyana FUFINA
and Ivan PROSKURYAKOV**

Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino,
Moscow Region, Russia
E-mail: pros@issp.serpukhov.su, FAX: 8 (4967) 7330532

Photoinduced electron transfer in reaction centers of purple bacteria is known to proceed almost independent of temperature until the charge is localized on the primary quinone acceptor Q_A . Its subsequent transition to the secondary acceptor Q_B is, however, temperature-dependent, and is frozen out below ca. 200 K. Much evidence has been accumulated pointing at conformational changes accompanying (or preceding) electron transfer from Q_A^- to Q_B . In [1] the secondary acceptor movement was proposed to be the actual molecular mechanism of such change. A possibility remains that movement of the primary acceptor Q_A may also contribute to the electron-transfer reaction. Theoretically, spin-polarized EPR spectra of the primary radical pair [$P^+Q_A^-$] are sensitive to its geometry and thus to the movements of Q_A . Here we report on the study of the RP2 spectra detected with different time delays after the excitation flash. EPR spectroscopy was performed at very low microwave power to avoid the negative effect of induced spin-lattice relaxation of the signals. The RP2 spectra dynamics showed a 100- μ s component. The time is comparable to the characteristic time of electron transfer to Q_B , and we interpret the changes as the reflection of Q_A movement in this process. Preliminary spectral simulations demonstrated that the EPR spectrum observed 100–200 μ s after RP creation can be obtained by ca. 20° rotation of Q_A around its X magnetic axis (O-O direction of the molecule).

This work was supported by the RFBR grant 05-04-49129.

1. M. S. Graige, G. Feher and M. Y. Okamura, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 95, pp. 11679–11684, 1998

**MODELING BINDING SITES OF IRON-SULFUR CLUSTERS
IN PHOTOSYSTEM I**

**Mikhail L. ANTONKINE¹, Melissa KOAY¹, Boris EPEL¹,
Christoph BREITENSTEIN¹, Oxana GOPTA², Eckhard BILL¹,
Wolfgang GÄRTNER¹ and Wolfgang LUBITZ¹**

¹Max-Planck-Institut für Bioorganische Chemie, Stiftstr. 34-36, D-45470 Mülheim/
Ruhr, Germany

E-mail: antonkin@mpi-muelheim.mpg.de, FAX: 49 208 306 3951

²A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University,
Vorob'evi Gori, 119899, Moscow, Russia.

Photosystem I (PS I) is a membrane-bound pigment-protein complex found in photosynthetic organisms. The terminal electron transfer acceptors in PS I are three [4Fe-4S] clusters named F_X , F_A and F_B . In this work we modeled their binding sites by preparing synthetic peptides. Peptides modeling F_A and F_B binding sites incorporate the consensus ferredoxin iron-sulfur binding motif along with amino acids from the immediate environment of the respective iron-sulfur cluster. The F_X cluster in PS I is an inter-polypeptide cluster located between the two subunits, PsaA and PsaB. Both of them contain a conserved **P**C**D**G**P**G**R**G**G**T**C** binding motif. Here we designed a *single* peptide which incorporates the two inter-polypeptide loops in one peptide strand

The [4Fe-4S] clusters were successfully incorporated into all constructed model peptides, as shown by optical absorbance, EPR and Mössbauer spectroscopies. The oxidation-reduction potential of the [4Fe-4S] clusters in peptides modeling F_A and F_B is close to that of native F_A and F_B in PS I. [4Fe-4S] cluster bound to peptide modeling binding site of F_X has a potential close to the potential of peptides modeling F_A and F_B , which is much higher than the potential of the native [4Fe-4S] cluster F_X in PS I. Note, that in all our models the oxidation-reduction potential is considerably lower than that observed in [4Fe-4S] model systems described earlier [1].

Comparison of continuous wave and pulsed EPR, Electron-Nuclear DOuble Resonance (ENDOR) and Mössbauer spectra of the peptides modeling F_A and F_B [4Fe-4S] clusters with the respective spectra of F_A and F_B shows that the environment of the clusters in the model system is very similar. Changes in the back-reaction kinetics show that both model peptides are capable of binding to the PS I complex devoid of PsaC subunit.

[1] Gibney, B. R., Mulholland, S. E., Rabanal, E. and Dutton, P. L. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 15041–15046

**THE CAROTENOIDS OF SULFUR BACTERIUM CAPABLE
TO PRODUCE SINGLET OXYGEN UNDER LIGHT**

Andrey MOSKALENKO, Zoya MAKHNEVA and Yuri EROKHIN

Institute of Basic Biological Problems, Pushchino, Moscow region, 142290, Russia
E-mail: andrey-mos@issp.serpukhov.su; FAX: +7-4967-330532

Carotenoids were believed to perform five different functions in bacterial photosynthesis: light harvesting, photoprotection, singlet oxygen scavenging, excess energy dissipation and structure stabilization. We have revealed a new function of carotenoids: their ability to produce singlet oxygen under the light causing oxidation of Bchl dimers (band at 855 nm) in the LH2 complex of *Allochroamatium minutissimum*.

The conclusion was made based on the following data:

1. Photooxidation of Bchl dimer takes place in the carotenoid containing cells, but it is absent in the cells without carotenoids. This is accompanied with the appearance of the band of oxidation products with band absorbing at 695 nm. In the carotenoidless cell we have measured only photodegradation of the Bchl's molecules without any appearance of the product of photooxidation.

2. The same photooxidation process was recorded in the membranes with carotenoids or in the isolated LH2 complexes.

3. It is registered only in the presence of oxygen and is interrupted after removal of the last one or substitution of the oxygen by argon.

4. This process was well simulated in the membranes or isolated LH2 complexes by direct chemical oxidation with ferricyanide.

5. The quenchers of singlet oxygen (sodium ascorbate, benzoquinone and CPH ([1-hydroxy-3-carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidon]) interrupt this process with different efficiency (100% ASC, 70-80% BQ and CPH)

The carotenoids according to the modern conception can not be able to produce singlet oxygen under the light as it is forbidden in spite of their singlet levels [S2 ($^1B_u^+$) and S3 ($^1B_u^-$)] possesses enough energy. Only one possible appearance of the singlet oxygen in the cell was considered: it was formed via interaction of oxygen with triplet level of Bchl. We have shown in the given work that oxidation of Bchl in the carotenoidless cell was practically absent, but singlet oxygen appeared via interaction with carotenoids according the following scheme:



This work was supported by RFBR grant № 48516

T1.9

**PURPLE BACTERIA REACTION CENTERS WITH MODIFIED PIGMENT
AND AMINOACID COMPOSITION**

**Anatoly SHKUROPATOV, Aleksei ZABELIN, Tatyana FUFINA,
Liudmila VASILIEVA, Margarita ZVEREVA, Valentina SHKUROPATOVA
and Vladimir SHUVALOV**

Institute of Basic Biological Problems, RAS, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia
E-mail: ashkur@mail.ru; Fax: +7-496-77-330-52

Photosynthetic reaction centers (RCs) are complicated molecular systems, spectral and functional properties of which are determined by both physico-chemical characteristics of individual chromophores and their intermolecular interactions. It makes it difficult to study primary process of photosynthesis on the molecular level in intact RC preparations.

One of the approaches to solve many of these problems is to apply to RCs methods of site-directed chemical and genetic modification of electron-transfer cofactors and protein subunits.

In this report, the effects of selective chemical exchange of bacteriopheophytins with plant pheophytin on spectral and electron-transfer properties of bacterial RCs are briefly discussed.

The significant attention is given to spectral and structural properties, as well as pigment-protein interactions, in the mutant RC I(L177)H *Rb. sphaeroides* that is characterized by unusually tight, probably covalent attachment of one of the bacteriochlorophyll molecule to the L protein subunit. Methods of photoinduced difference FTIR spectroscopy, circular dichroism and phototrapping of the reduced bacteriopheophytin acceptor H_A^- are employed for this purpose. A possible molecular mechanism for the formation of a putative covalent bond is discussed.

T1.10

**PROPERTIES OF *D. A6A435F7DEB*: 37DA; 67EMUTANT I(L177)H
REACTION CENTER**

**L.G. VASILIEVA, T.Y. FUFINA, R.A. KHATYPOV
and V.A. SHUVALOV**

Institute of Basic Biological Problems, RAS, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia
E-mail: vasilieva@issp.serpukhov.su, FAX: 4967-33-05-33

The bacterial photosynthetic reaction center (RC) consists of three protein subunits and 10 cofactors. The RC cofactors are arranged in two symmetrical branches labeled A and B. Each branch starts with the primary electron donor P, proceeds via a monomeric bacteriochlorophyll (BChl) molecule and a bacteriopheophytin molecule and terminates with a quinone acceptor. The efficiency of the photochemical charge separation in RC depends on the properties of electron transfer cofactors, their positions and interactions with each other and with the surrounding protein environment. Recently new mutant of *Rb. sphaeroides* was described that had I(L177)H substitution in the RC [1]. L177 position is located in the vicinity of B_B and P_A . Our results show that the mutation strongly affects the spectral properties of BChls. The mutant RCs were found to be active in charge separation with the quantum yield of $P^+Q_A^-$ state formation similar to that in the wild-type RC. $E_m P/P^+$ in I(L177)H RC was shown to be decreased by 50 mV. Pigment analysis shows different BChl content in pigment extracts from RCs I(L177)H and the wild type RCs. The acetone – methanol (7:2) extract from the wild type RCs contains four BChls and two BPheos per RC and the extract from the mutant I(L177)H RCs contains three BChl molecules and two BPheos per RC. It was noticed that the color of the denaturated I(L177)H RC protein remained green even after multiple steps of pigment extraction by variety of organic solvents. It was estimated that approximately one BChl molecule (0.7 ± 0.05) per one I(L177)H RC remains attached to the RC protein. During SDS PAGE the attached BChl moves through the gel along with L-subunit of I(L177)H RC indicating covalent binding of the pigment and the mutated protein [2]. Hitherto there is no data on a chromophore – protein covalent binding in photosynthetic membrane pigment – protein complexes. Putative origin of the pigment-protein covalent binding will be discussed. The RC I(L177)H seems to be a promising example for the study of protein-cofactor interactions in photosynthetic complexes.

Authors acknowledge the support by the Russian Foundation for Basic Research (06-04-48686) and Russian Academy of Sciences.

1. R.A. Khatypov, L.G. Vasilieva, T.Y. Fufina, T.I. Bolgarina, and V.A. Shuvalov, *Biochemistry* (Rus) 2005, 70, 1256–1261

2. Fufina T. Y., Vasilieva L. G., Khatypov R. A., Shkuropatov A. Ya., Shuvalov V. A., *FEBS Lett.*, 2007, 581, 30, 5769–5773

T1.11

**ENERGY TRANSFER AND THE PRIMARY CHARGE SEPARATION
IN THE ISOLATED REACTION CENTER. MODELLING OF THE EXCITON
DYNAMICS BASED ON THE PUMP-PROBE SPECTROSCOPY**

**Roman Y. PISHCHALNIKOV¹, Marc G. MÜLLER²
and Alfred R. HOLZWARTH²**

¹A.N.Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University,
Moscow 119991, Russia

E-mail: pishchalnikov@inbox.ru; Fax: +7-495-939-31-81

²Max Planck Institute for Bioinorganic Chemistry, D-45470 Mülheim an der Ruhr,
Stiftstr. 34-36, Germany

To model kinetics and the radical-pair states time evolution of the isolated PSII reaction center, we applied the modified Redfield theory. This theory implies the doorway-window representation derived using projection operator techniques. We considered the 40 vibronic modes spectral density function to describe the absorption properties of a monomer chlorophyll molecule and to calculate the exciton transfer rates. Assuming that the primary electron donor is the D1 accessory chlorophyll, we got the profile of first radical-pair state formation rate distribution as a result of inhomogeneous broadening of the site energies. The exciton and the radical-pair states time evolution were simulated via system density matrix kinetics equations. The radical-pair states pump-probe spectra were calculated by using the solver routine of an over-determined system of linear equations. To make fitting, we used the differential evolution algorithm. The choice of the proper strategy and two tuning parameters allowed us to get a reasonable rate of convergence. The following parameters were taken as free parameters necessary to fit: the dielectric constant, the site energies of pigments, the energy shift between the first and the second exciton states, the ratio between S_0 - S_1 and S_1 - S_2 transition moments, and two scaling factors used to bring to conformity the exciton pump-probe spectra and the radical-pair states pump-probe spectra. This work was supported in part by the RFBR grant No.06-04-49072.

ON THE ORIGIN OF TWO CHLOROPHYLL PHOSPHORESCENCE BANDS IN CHLOROPLAST THYLAKOIDS**K.V. NEVEROV^{1,2}, Yu.V. KOVALEV² and A.A. KRASNOVSKY^{1,2}**

¹A.N. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Science, Leninskii prospekt, 33, 119071 Moscow;
E-mail: neverovk@mail.ru

²Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Vorobjevy Gori, 119899 Moscow, Russia

It was reported in the prior papers of our laboratory that phosphorescence of the triplet chlorophyll "a" (Chl) molecules is observed in green leaves and isolated chloroplasts at 77K. In all samples, two phosphorescence bands were observed at 950–955 and 975–980 nm. The phosphorescence lifetimes were 2 and 1.2–1.5 ms respectively. The latter indicates that the phosphorescence belongs to the Chl molecules whose triplet states are not quenched by carotenoids. On the other hand, the maxima of Chls "a" and "b" and carotenoids appear in the excitation spectra of the overall phosphorescence emission.

In the present paper, we found that 2-5-dibromo-6-isopropyl-3-methyl-1,4-benzoquinone (DBMIB), known to be an efficient quencher of the Chl fluorescence in thylakoids, strongly quenched the 980 nm phosphorescence band and almost did not influence the 955 nm band. In addition, the Chl "b" band at 650 nm was not detected in the phosphorescence excitation spectra of the DBMIB-treated samples. This suggests that Chl molecules responsible for the 980 nm band are connected with the antenna complexes whereas Chl molecules responsible for the 955 nm band are energetically uncoupled with the light harvesting chlorophyll proteins (CPs). To understand origin of these bands, we studied plant leaves treated with aminolevulinic acid (Chl biosynthesis stimulator) and the isolated reaction centers (RC) of the PS 2. After dark incubation of plants with ALA followed by 1-2 hour light exposure, we detected rise of the 955 nm band. In the isolated PS 2 reaction centers, we also observed two phosphorescence bands. The shorter band at 955 nm was found to be more efficiently quenched after freezing of the illuminated RC samples in the presence of FeCy than the 980 nm band, therefore it is likely that Chl molecules responsible for these bands are located respectively on the surface and inside the hydrophobic part of the D1D2 heterodimer.

The data suggest that the observed bands of Chl phosphorescence are connected with quite different pigment protein complexes. The short wavelength band is likely related to uncoupled Chl of newly formed and/or damaged CPs, and the longer band corresponds to Chl of the PS 2 reaction centers, probably to the special pair P680.

T1.13

**PS II MODEL APPLICATION TO ANALYZE CHL SFLUORESCENCE
OJIP RISE, MONITORED ON P;*EG?* *E3F*; *HG?* LEAVES AFTER
IONOPHORE TREATMENT**

**N.E. BELYAeva, A.A. BULYCHEV, G. Yu. RIZNICHENKO
and A.B. RUBIN**

Department of Biophysics, Biology Faculty of the M.V. Lomonosov Moscow State
University, 119992, Moscow, Russia
E-mail: natalmurav@yandex.ru, Fax: +7(495)939-11-15

To study dynamics and efficiency of the primary processes of photosynthesis information can be gathered from fluorescence (FL) data that are monitored under different excitation conditions and analyzed by means of appropriate mathematical models. The generalized model to describe the thylakoid membranes transfer processes was developed [1] that included the photosystem II (PS II) reactions pattern. PS II model block was applied to simulate electron transfer processes under the experimental illumination conditions when the transmembrane electric potential $\Delta\Phi$ and the pH values of lumen and stroma are assumed to remain constant [3].

Furthermore, the PS II reaction pattern was modified by taking into account nonradiative decay processes including nonphotochemical quenching due to time dependent populations of P680⁺ and ³Car. The PS II model was applied to fit FL induction (FI) data that were measured under continuous illumination in the time range from 0 to 1 s on *Pisum sativum* leaves after the treatment with ionophores (valinomycin + monensin). Based on data reported in the literature for pea chloroplasts [2] a consistent set of rate constants was obtained for electron transfer at the donor and acceptor side of PS II. To attain the perfect data fitting for low and high light intensity it was necessary to increase the rate constant values of dissipative processes in accordance with light intensity intensification. The time courses of population probabilities of different PSII states were compared to imitate the maximal FL yield quenching (lowering) attainable under (1) lumen acidification, (2) the dissipative processes intensification in antenna complexes as well as due to separated charges recombination.

This work was supported by the RFBR grants 07-04-00375, 07-04-00132a.

1. Lebedeva G.V., Belyaeva N.E., Demin O.V., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. (2002) *Biophysics* 47:968–980
2. Roelofs T.A., Lee C.H., Holzwarth A.R. (1992) *Biophys. J.* 61:1147–1163
3. Belyaeva N.E., Paschenko V.Z., Renger G., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. (2006) *Biophysics* 51:960–972

T1.14

**LIPIDS, QUINONES AND CHANNELS - CURRENT STATE OF THE
STRUCTURAL MODEL OF CYANOBACTERIAL PHOTOSYSTEM II**

**Albert GUSKOV¹, Jan KERN², Matthias BROSER²,
Azad GABDULKHAKOV¹, Athina ZOUNI² and Wolfram SAENGER¹**

¹Institut für Chemie und Biochemie/Kristallographie, Freie Universität Berlin, Taku
str. 6, D-14195 Berlin, Germany

E-mail: guskov@chemie.fu-berlin.de; FAX: +49 3083856702

²Institut für Chemie/Max Volmer Laboratorium für Biophysikalische Chemie, Technische
Universität Berlin, Strasse des 17. Juni 135, D-10623 Berlin, Germany

The large membrane intrinsic protein complex Photosystem II (PSII) catalyses light-driven charge separation accompanied by the oxidation of water to atmospheric oxygen during oxygenic photosynthesis.

In this contribution the structure of PSII will be described with special emphasis on the role of plastoquinone mobility and possible mechanisms of plastoquinone exchange between PSII and the thylakoid membrane. In addition the role of lipids in PSII will be discussed. Also a short overview of the several postulated substrate and product channels in PSII will be given.

T1.15

**MODELLING OF TWO PRIMARY QUINONE'S CONFORMATIONS,
INFLUENCING ELECTRON TRANSFER RATE WITHIN
*D4ŽEB; 37DA; 6 ŽERC.***

**Peter A. MAMONOV, Pavel M. KRASILNIKOV, Peter P. KNOX
and Andrew B. RUBIN**

Biological Faculty of Lomonosov Moscow State University, Biophysics Dept. 1/12
Leninskie Gory, Moscow, Russia, 119992
E-mail: piton@erg.biophys.msu.ru

The paper concerns identification of conformational motions triggered by one-electron reduction of primary quinone within photosynthetic reaction center (RC) of purple bacteria *Rhodobacter sphaeroides*. For this purpose a conformational mobility of neutral and semiquinone forms of primary quinone was investigated using quantum-chemical approach. Geometry optimization of a model, including primary quinone and its neighbours, evidences a presence of two stable conformations of primary quinone. The conformations are different in primary quinone orientation: in one conformation the quinone is hydrogen-bonded to histidine M219, and in the other one – to threonine M222. The energies of appropriate conformational rearrangements were calculated.

A kinetic model describing recombination rate temperature dependence in RCs frozen in the dark and upon illumination [1] was suggested based on the results of quantum-chemical calculations. The model supposes existence of two conformational states of RC different in electron transfer rate between primary quinone and bacteriochlorophyll special pair. According the model, recombination rate temperature dependence arises from changes in the conformational states populations. The model fits experimental data satisfactorily.

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research: project 07-04-00212.

1. B.H. McMahon, J.D. Muller, C.A. Wraight, U.G. Nienhaus Electron Transfer and Protein Dynamics in the Photosynthetic Reaction Center, *Biophysical Journal*, 1998, 74, 2567–2587

TUNNELS IN CYANOBACTERIAL PHOTOSYSTEM II

**Azat GABDULKHAKOV¹, Albert GUSKOV¹, Matthias BROSER², Jan KERN²,
Athina ZOUNI² and Wolfram SAENGER¹**

¹Institute for Crystallography, Free University Berlin, Takustrasse 6, D-14195 Berlin, Germany;

E-mail: azat@chemie.fu-berlin.de; Fax: +49 030-838 567 02;

²Max-Volmer-Laboratorium, Technical University Berlin, Strasse des 17. Juni 135, D-10623 Berlin, Germany

Photosystem II (PSII) is a large, homodimeric protein-cofactor complex located in the photosynthetic thylakoid membrane and catalyzes the initial reactions of oxygenic photosynthesis by oxidizing water to dioxygen, protons and electrons. An optimized transport of substrate (water) and products (protons, dioxygen) is essential for efficient catalysis. An analysis of possible tunnels connecting Mn₄Ca cluster with the luminal part of PSII was done and results were compared to the previous studies.

Also recent results obtained from Xe-derivatized crystals will be presented and discussed.

OPTIMAL INTERFACING OF SUBANTENNAE AS AN EFFICIENT STRATEGY FOR LIGHT HARVESTING IN PHOTOSYNTHESIS

Anastasiya ZOBOVA, Alexandra TAI SOVA, Nataly FEDOROVA, Eugeny LUKASHEV, Ludmila BARATOVA and Zoya FETISOVA

M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119992, Russia;
E-mail: Zoana@mail.ru; Zfetisova@genebee.msu.su ; Fax: +7-495-9393181

This work deals with a search for an optimal constitution of subantennae in photosynthetic light-harvesting superantenna of the green filamentous bacterium *Oscillochloris trichoides* from the third family of green bacteria (*Oscillochloridaceae*, registered in 2000). At present, two subantennae were identified surely: chlorosomal BChl *c* subantenna B750 and membrane BChl *a* subantennae B805-860. Some indirect experiments indicated on the presence of minor amounts of BChl *a* in isolated chlorosomes, however, in absorption spectra of isolated chlorosomes, this BChl *a* subantenna was not visually identified. Using mathematical modeling of the functioning of the natural antenna, we showed that such intermediate-energy BChl *a* subantenna (presumably B798), connecting B750 and B805-860 ones, allows one to control the superantenna efficiency, i.e., to optimize the superantenna structure by functional criterion. Hence, the existence of such intermediate-energy subantenna is biologically expedient [Biofiz., 2007, 52(1), 63–68]. Decisive experimental proof of the existence of the intermediate BChl *a* subantenna in *Osc. trichoides* chlorosomes was demonstrated by strong alkaline treatment of isolated chlorosomes (leading to selective degradation of BChl *a*, whereas BChl *c* was not affected) with concurrent analysis of the effect of the treatment on (i) chlorosomal proteins (by SDS-PAG electrophoresis) and on (ii) low-temperature fluorescence spectra of chlorosomes. Three major proteins, with apparent molecular weights of ~6, ~11 and ~18 kDa, were found in isolated *Osc. trichoides* chlorosomes. Upon alkaline treatment, only the 6 kDa protein was removed from the chlorosomes concomitantly with the disappearance of BChl *a* fluorescence (peaked at 821 nm at 77 K). BChl *c* fluorescence (peaked at ~780 nm at 77 K) remained unlike BChl *a* fluorescence. Selective BChl *a* and 6 kDa protein disappearance should be expected only in case when both of them are located out of the BChl *c* body, i.e., within the baseplate of the chlorosome. So, it was shown that BChl *a* is associated with 6 kDa protein in *Osc. trichoides* chlorosomes. Thus, we proved that the intermediate-energy BChl *a* subantenna in *Osc. trichoides* chlorosomes connecting B750 and B805-860 ones does exist.

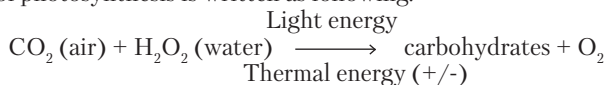
This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grant # 08-04-01587).

ABOUT PS1 AND PS2
Gennady KOMISSAROV

N.N.Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
 Kosygin St. 4, Moscow 119991, Russia
 E-mail: gkomiss@yandex.ru; FAX: (095) 651-2191.

A photovoltaic battery, a functional model of chloroplast has been constructed for the first time in the world in the Institute of Chemical Physics. The battery was characterized by the following parameters: the light potential reached 2.4 V; the current was $5,6 \times 10^{-5}$ A; the quantum yield on photocurrent was 0,01–0,1% [1]. The quantum yield was then increased to tens percents [2].

In 1993 we proposed a new concept of photosynthesis [2, 3]. The main point of it is: the source of oxygen (hydrogen) in the photosynthesis process is not water (as accepted till now) but hydrogen peroxide of exo- and endogenous origin. The main equation of photosynthesis is written as following:



The sign (+/-) in equation means that a leaf gives back thermal energy to environment at big intensity of light and works as the thermal pump at small intensity.

Functioning of PS1 and PS2 *in vivo* will be discussed on the basis of model experiments, new concept of photosynthesis and literature data. The main conclusion is that the idea of existence of two photosystems has to be corrected.

References

1. Komissarov G.G., Shumov Yu.S., Borisevich Yu.E. Dokl. AN SSR, 1968, 182, 1226.
2. Komissarov G.G. Photosynthesis: the physical-chemical approach // M. Editorial URSS, 2003. 223 P. (in Russian); Komissarov G.G. Fotosintesis: un enfoque fisicoquimico // M. Editorial URSS, 2005, 258 (in Spanish).
3. Komissarov G.G. Abstr. 11th Intern. Biophys. Congr. Hungary, 1993, E1.41.

**PROPERTIES OF THE PHOTOSYNTHETIC REACTION
CENTERS *D*: *A6A435F7DEB*: *37DA*; *67E* WITH AMINO ACID
SUBSTITUTIONS OF AXIAL LIGANDS TO Mg OF THE MONOMER
BACTERIOCHLOROPHYLLS**

**Maria M. LEONOVA, Lyudmila G. VASILIEVA, Ravil A. KHATYPOV,
Anton Yu. KHMELNITSKYI and Vladimir A. SHUVALOV**

Institute of Basic Biological Problems, Pushchino, Russia
E-mail: Leonova-mari@yandex.ru, FAX: +7(496)733-05-32

The reaction center of *Rb. sphaeroides* is a membrane-bound pigment-protein complex where the photosynthetic charge separation occurs. Direction and effectiveness of photochemical reactions within RC depends on the interaction of the cofactors with each other and with the protein environment. His L153 and M182 serve as the axial ligands for the monomer bacteriochlorophyll (BChl) molecules B_A and B_B, respectively. Replacement of His M182 by Leu results in substitution of bacteriochlorophyll B_B with bacteriopheophytin B_B⁻. We describe two site-directed RC mutants of *Rb. sphaeroides* – single mutant, H(L153)Y and double mutant, H(L153)Y+H(M182)L. Because of instability of these mutant RCs their properties were studied without isolation from the photosynthetic membranes using *Rb. sphaeroides* antenna-less strain.

In the absorption spectrum of membrane-bound RCs H(L153)Y the 802 nm absorption band was absent. The results of the pigment analysis confirm that the B_A molecule is missing in the H(L153)Y RC. Nevertheless, being associated with photosynthetic membranes, these RCs were able to accomplish the photochemical charge separation showing quantum yield approximately 7 % comparing to that of the WT RCs. As it was expected both monomer BChl bands were missing in the absorption spectrum of membrane-bound H(L153)Y+H(M182)L RCs. The special pair band demonstrated two maxima at 844 and 860 nm. No photochemical activity was observed in the double mutant RCs in a long time scale, but femtosecond measurements have revealed the electron transfer to B-branch with a time constant ~2 ps.

Authors acknowledge the support by the Russian Basic Research Foundation (№ 06-04-48686), Russian Academy of Science.

**МНОГОЭЛЕКТРОННОЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ
ВОДЫ ДО ОЗОНА КРАСНЫМИ МОРСКИМИ ВОДОРОСЛЯМИ****Дмитрий МОИСЕЕВ**

Тулский филиал московской академии комплексной безопасности, Тула, 300044,
Россия
E-mail: mouseew@rambler.ru

Обнаружен и изучен процесс окисления воды до озона смесью красных морских водорослей *Polysiphonia* и *Phyllophora nervosa*. На начальных стадиях фотостимулированной реакции образования озона наблюдается небольшой индукционный период, снижение скорости процесса к концу реакции связано с расходом со временем углекислого газа в реакторе, запасы которого в ходе всего опыта не возобновлялись. Следует отметить, что скорость образования кислорода под действием видимого света на одних и тех же образцах морских водорослей превосходит скорость генерирования озона более чем на пять порядков. После завершения опыта было оценено число активных центров по суммарному количеству хлорофилла в реакторе, который был экстрагирован из высушенных красных морских водорослей эфиром. Исходя из того, что на один реакционный центр в ФС II в среднем приходится примерно четыреста молекул хлорофилла, было оценено число оборотов по кислороду на один активный центр $TN \approx 100 \text{ с}^{-1}$.

Малая скорость генерирования озона водорослями по сравнению со скоростью выделения кислорода связана, предположительно, с ничтожным содержанием $6Mn\text{-co}$ в активных центрах ФС II хлоропластов водорослей по сравнению с $4Mn\text{-co}$ [1]. В зеленых листьях высших растений содержится, вероятно, ещё меньше $6Mn\text{-co}$, поскольку нет никаких сведений о возможном образовании хотя бы следов озона при фотосинтезе с их участием.

Литература

1. Джабиев Т.С., Моисеев Д.Н., Шилов А.Е. // Докл. РАН. 2005. Т. 402. № 4. С. 555

P1.6

HIGH EXCITONIC BAND OF BCHL DIMER IN RCS FROM WILD TYPE *D. AGA435F7DEB: 37DA; 67E* AND FROM MUTANT WITH SUBSTITUTION OF ISOLEUCINE L177 BY HISTIDINE. THE STUDY BY MEANS OF HIGH ORDER DERIVATIVE SPECTROSCOPY

Grigory RUDANOV¹, Ludmila G. VASILYEVA² and Andrei P. RAZJIVIN¹

¹A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Build. "A", Moscow State University, Moscow, 119899, Russia.

E-mail: greg_sar@mail.ru

²Institute of Basic Biological Problems, ul. Institutskaya 2, Pushchino, Moscow Region 142290, Russia.

The influence of the L177 isoleucine replacement by histidine on the position of upper excitonic level (P⁺) of bacteriochlorophyll (BChl) dimer of reaction centers isolated from *Rhodobacter sphaeroides* was investigated. To do this, the RC's absorption spectra, measured within 650–1100 nm range, were decomposed into the set of Gaussian bands using high order derivative spectroscopy technique, which was previously described [1]. Absorption spectra were carried out at room temperature using UV 1601PC (Shimadzu) spectrophotometer. Absorption band corresponding to the upper excitonic level and overlapping with bacteriochlorophyll monomer absorption band near 800 nm was identified by its amplitude decrease directly proportional to the amplitude decrease of lower excitonic level (P⁻) band due to RCs oxidation. We showed that the P⁺ peak is at ~814.7 nm in absorption spectra of the wild type RCs and at ~811.8 nm in the case of the mutant. This ~3 nm blue shift of the P⁺ band was found significantly smaller than the P⁻ band shift – from 865.6 nm to 849 nm.

This work has been supported in part by the RFBR grant № 06-04-49072.

[1] Mikhailyuk I.K., Lokstein H., Razjivin A.P. A method of spectral subband decomposition by simultaneous fitting the initial spectrum and a set of its derivatives // *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2005. Vol. 63., No. 1., P. 10–23

**PHOTOVOLTAGE MEASUREMENTS OF MANGANESE-DEPLETED/
RECONSTITUTED PHOTOSYSTEM II CORE COMPLEXES
INCORPORATED INTO LIPID VESICLES**

**Vasily KURASHOV¹, Sergey ZHARMUKHAMEDOV²,
Alexey SEMENOV¹ and Mahir MAMEDOV¹**

¹A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University,
119991 Moscow, Vorob'evy gory, GSP-2, Russia
E-mail: mamedov@genebee.msu.su

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

Reconstitution of the electron transfer reaction between exogenous Mn^{2+} and the redox-active tyrosine of the D1 subunit (Y_z) of Mn-depleted photosystem II (PS II) core complexes incorporated into liposomes was studied by photoinduced change of chlorophyll fluorescence yield as well as by measurements of the voltage changes using a direct electrometrical technique. In the presence of $MnCl_2$ (~4 Mn/RC), the fast generation of a membrane potential related to electron transfer from Y_z to primary quinone acceptor Q_A was followed by a new electrogenic phase, as well as slowing down of the decay. The increase of the relative contribution of the slow component(s) of the membrane potential decay kinetics indicate the effective interaction between Mn^{2+} and Y_z^{ox} . That additional phase, which contributes ~4 % (~50 μs) to the $Y_z^{ox}Q_A^-$ is ascribed to the vectorial transfer of an electron from the Mn^{2+} to the protein embedded Y_z^{ox} . Since the contribution of this electrogenic phase is the same to that of the phase observed earlier in PS II core particles with active oxygen-evolving complex (*Haumann et al. 1999; Mamedov et al. 1999*) upon the first flash, we assume that dielectric permittivity between Mn-binding site and Y_z in native and Mn-depleted PS II core complexes is similar.

**ELECTRON TRANSFER VIA THE LOW-AFFINITY Mn-BINDING SITE
IN THE Mn-DEPLETED PHOTOSYSTEM II CORE COMPLEXES****Vasily KURASHOV¹, Elena LOVYAGINA², Mahir MAMEDOV¹,
Alexey SEMENOV¹, Il'ya IVANOV² and Boris SEMIN²**¹A.N.Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University,
Moscow, 119992, Russia

E-mail: loviagina@biophys.msu.ru

²Department of Biophysics, Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow,
119992, Russia

In the Mn-depleted Photosystem II complexes [PS II (-Mn)] there are two oxidation sites for exogenous electron donors with a different extent of affinity to them [1]. One of the sites is a high-affinity site through which the redox active tyrosine of the D1 subunit (Y_z) is reduced and electron transfer from Mn^{2+} to Y_z is electrogenic [2, 3]. The localization of the low-affinity site and the nature of endogenous oxidant for the compounds bound at this site are not clarified. In the present work, we have tried to investigate the electron transfer reaction through the low-affinity site by the blocking of the high-affinity site by ferric cations [4]. Such methodological approach allows to investigate electron transfer reactions through the low-affinity site without any contribution from high-affinity site. Using monitoring of fluorescence induction kinetics and variable fluorescence, it was shown that electron donation through the high-affinity site (10 μM exogenous Mn^{2+}) in [PS II(-Mn, + Fe)] preparations does not occur. Upon the increasing concentration of exogenous Mn^{2+} (100–400 μM), the oxidation of Mn^{2+} at the low-affinity site was observed. Comparative investigation of the data derived from proteoliposomes containing PS II(-Mn) and PS II(-Mn, + Fe) core complexes using a direct electrometrical method provide evidence that photo-induced electron transfer from Mn^{2+} through the low-affinity site to endogenous oxidant does not contribute to overall electrogenicity, i.e. this reaction is electrically silent.

1. Blubaugh D.J. and Cheniae G.M., *Biochemistry* 1990, 29, 5109–5118.2. Мамедов М.Д., Ловягина Е.Р., Верховский М.И., Семёнов А.Ю., Черепанов Д.А., Шинкарёв В.П., *Биохимия* 1994, т. 59, 685–689.3. Haumann M, Mulikidjanian A, Junge W. *Biochemistry* 1997, 36, 9304–9315.4. Semin B.K., Ghirardi M.L., Seibert M., *Biochemistry* 2002, 41, 5854–5864

**TIME-RESOLVED STUDY OF TS_{60} CYTOCHROME OXIDASE FROM
*F: 7D? GEF: 7D? AB: ;>GE***

**Sergey A. SILETSKY¹, Ilya BELEVICH², Audrius JASAITIS³,
 Alexander A. KONSTANTINOV¹, Mårten WIKSTRÖM², Tewfik SOULIMANE⁴
 and Michael I. VERKHOVSKY²**

¹Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, Russia; E-mail: siletsky@genebee.msu.su, FAX: 939-31-81

²HBG, Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Helsinki, Finland

³European Laboratory for Non-Linear Spectroscopy, University of Florence, Italy

⁴Materials and Surface Science Institute, University of Limerick, Ireland

Cytochrome oxidase of ba_3 -type from *Thermus thermophilus* belongs to the large family of structurally related heme-copper terminal oxidases. The enzyme contains four redox-centres: Cu_A , low-spin heme b, and binuclear oxygen-reducing centre, including Cu_B and heme a_3 . Cytochrome ba_3 catalyses the process of oxygen reduction to water and couples it with creation of an electrochemical transmembrane gradient of protons, which is subsequently used for ATP synthesis. Laser flash-induced generation of a membrane potential by the cytochrome ba_3 and parallel spectroscopy changes, caused by intraprotein electron transfer, have been studied in a μ s/ms time scale by using of: a) flash-induced single electron reduction of the aerobically oxidized ba_3 (**O**-state) with Ru(II)-tris-bipyridyl complex (RuBpy) as a photoreductant; and b) flash-induced oxidation of fully-reduced ba_3 oxidase by oxygen. Single electron photoreduction of the oxidized ba_3 with help of RuBpy (**O** \rightarrow **E** transition) results in two phases of membrane potential generation. The rapid phase reflects the electrogenic electron transfer from Cu_A to heme b, while the slow phase results most probably from the electrogenic proton transfer, coupled to reoxidation of heme b by the binuclear centre. Four catalytic intermediates were resolved during the kinetics of the oxidation of fully-reduced ba_3 oxidase by oxygen. The chemical nature and the spectral properties of three intermediates (**A**, **P**, **O**) reproduce the general features of aa_3 -type oxidases. However the **F** intermediate in ba_3 oxidase has a spectrum identical to the **P** state. This indicates that the proton taken up during the **P** \rightarrow **F** transition does not reside in the binuclear site but is rather transferred to the covalently cross-linked tyrosine near that site. The total charge translocation associated with the **F** \rightarrow **O** transition in ba_3 oxidase is close to that observed during the **F** \rightarrow **O** transition in the aa_3 oxidases. However, **P** \rightarrow **F** is characterized by significantly lower charge translocation, which probably reflects the overall lower measured pumping efficiency during multiple turnovers.

P1.10

**STUDY OF THE EFFECT OF LOW PH VALUES ON THE
CHROMATOPHORES, RC+LH1 ENSEMBLES AND LH2-COMPLEXES
ISOLATED FROM *Spirillum rubrum*: DA, BF, G, GF, EE, G**

A.A. SOLOV'EV and YU.E. EROKHIN

Institute of Basic Biological Problems, RAS, Pushchino, Moscow region, Russia 142290
E-mail: alex_1_i@mail.ru; FAX +7(4967) 330532

The pigment-protein complexes of the peripheral and core antennas of purple bacteria are unique nanobiophotoconverters which have been much studied both on their structure and function. We have attempted to study in this work the role and the contribution of bacteriochlorophyll (bchl) molecules in formation, organization and stabilization of unique circle structures of these complexes. Using spectral methods we have traced the behavior and the kinetics of pheophytinization in chromatophores membranes which were isolated from normal and carotenoidless cells of purple bacteria *Alc. minutissimum*, as well as in the ensembles of RC+LH1 and LH2-complexes isolated with different detergents (triton X-100, sodium dodecyl sulfate, -dodecylmaltoside, LDAO) at various pH values. It has been shown that by matching pH and/or the detergent used one may clearly observe three stages of destruction of the native forms of bchl: 1) bchl monomerization; 2) pheophytinization of the monomer bchl formed; 3) aggregation of the bacteriopheophytin formed. It has been previously ascertained that carotenoidless pigment-protein complexes keep the forms B800, B 850 and B 870; however, as compared with initial carotenoid complexes they are less stable to the effect of low pH values, especially at monomerization and pheophytinization of bchl. Using gel electrophoresis and gel chromatography these spectral changes have been shown to be followed by damages of the circle structures of the complexes with the appearance of typical fragments (heterodimers ζ - and η -peptides, their oligomers or separate ζ - and η -chains etc.). Thus, it is possible to gain an idea on the contribution of bchl in keeping integrity of the circle structures of these complexes.

TWO-PHOTON FLUORESCENCE EXCITATION OF BACTERIAL LH2 COMPLEXES: THE CONTRIBUTION OF “DARK” CAROTENOID STATES?

**I. STEPANENKO¹, V. KOMPANETZ², S. CHEKALIN², A. MOSKALENKO³
and A. RAZJIVIN¹**

¹A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow 119992
E-mail: razjivin@belozersky.msu.ru

²Institute of Spectroscopy RAS, 142192 Troitsk, Moscow Region, Russia

³Institute of Fundamental problems of Biology RAS, 142290 Pushchino, Moscow Region

The peripheral light-harvesting complex LH2 of purple bacteria contains carotenoids as secondary pigments, which harvest light quanta and efficiently transfer excitation energy to nearby bacteriochlorophyll (BChl) molecules. Strong absorption of carotenoids in the visible spectral region is the result of an electronic transition from the ground state to the higher singlet state S_2 . The first excited singlet state S_1 of carotenoids is optically “dark”, i.e. its radiative combination with S_0 is forbidden by the selection rules. However, direct two-photon transition $S_0 \rightarrow S_1$ is allowed. To clarify the role of S_1 state in energy transfer dynamics, its selective excitation would be highly desirable, which in turn requires knowledge of its energetic location.

We applied two-photon fluorescence (TPF) excitation spectroscopy to obtain excitation spectrum of the S_1 state of carotenoids. BChl fluorescence was measured after two-photon excitation of LH2 within 1200–1600 nm region. Spectra were measured both for carotenoid-containing and carotenoidless complexes to allow their direct comparison. We used native and carotenoid-depleted LH2 complexes from purple bacteria *Allochromatium minutissimum*. The native complexes contain rhodopin as main carotenoid.

Spectrum of native complexes featured wide excitation band around 1300 nm and strongly resembled TPF excitation spectra of similar complexes published earlier. However, the spectrum of carotenoid-depleted complexes was virtually the same. We consider a possibility of direct two-photon absorption of BChl in this spectral region. Also, further analysis showed, that 1300 nm band arises generally because of the strong water absorption in 1400–1800 nm region (water solutions were used for all samples).

This work was carried out with partial financial support of RFSI (grant № 06-04-49072).

NEW VIEW OF THE P680 – OXYGENIC PHOTOSYNTHESIS PRIMARY DONOR AS PHEOPHYTIN STRUCTURE**Juri STOLOVITSKY**

Institute of Basic Biological Problems, RAS, Pushchino, 142290, Russia
E-mail: stolov_y@mail.ru; Fax: +7-4967-33-05-32

Evaluation of the P680 midpoint oxidation potential by Klimov *et al* as +1.12 V is in good correlation with electrochemical requirements. However identification of the P680 as chlorophyll a dimer causes very important question on deficiency of the potential so far as the chlorophyll a oxidation potential in solution has been +0.81 V [1] and this value has been diminished by 0.1–0.3 V when dimerization occurs. Possible influences of *in vivo* environments on this potential have not been clarified enough up to date. Here we conclude that chlorophyll a midpoint oxidation potential can not be increased up to $\times 1$ V if red absorption band of the pigment has been replaced essentially to long-wavelength direction as it takes place indeed: 660–669 nm in solutions and ~680 nm *in vivo*.

Biochemical and X-ray analysis have revealed 4 chlorophyll a and 2 pheophytin a molecules in the PS 2 RC. Midpoint oxidation potential of pheophytin a in solution is +1.2 V [1] that is extremely large value for living cell scale and question arises: may be evolution has created and has built – in the RC this pigment for water oxidation exactly? Light absorption spectra of the pheophytin a molecules in solutions differ strongly from those of the P680. However the situation has been changed sharply for aggregates of the pheophytin a obtained by Gurinovich and coworkers, as mix of monomers and polymers containing dimer pheophytin elementary cells. We have continued their work and calculated spectrum of the pheophytin a aggregates only without monomers. This spectrum corresponds to the P680 one in large degree.

It has been concluded on basis of comparison of the oxidation potentials, absorption spectra and biosynthesis sequence for chlorophyll a and pheophytin a that the pigment form P680 is homodimer pheophytin a / pheophytin a or heterodimer pheophytin a / chlorophyll a.

References

1. M. Kasahara, S. Ohashi, S. Fukuyo, M. Nakazato, K. Iwamoto, Y. Shiraiwa, Y. Kato, T. Watanabe, M. Kobayashi. Abstracts: 14 International Congress of Photosynthesis, Glasgow, 2007, p. 156.

ELABORATION AND ANALYSIS OF A MATHEMATICAL MODEL OF THE PHOTOSYSTEM II IN THE HIGHER PLANTS**Vladimir SUKHOV, Vladimir VODENEEV and Vladimir OPRITOV**

University of Nizhni Novgorod, Russia, 603950, Nizhni Novgorod, pr. Gagarina, 23,
NNSU, Dept. of Biophysics
E-mail: vssuh@mail.ru; Ph. / FAX: (8)-831-465-61-06 / (8)-831-434-50-56

Mathematical modeling of the primary processes of the photosynthesis is an important method of their investigations. Now there are the mathematical models, which provide a good description of the photosynthetic reactions, but these models do not take into account the donor side of the photosystem II (PSII). Thus a goal of this study was elaboration and analysis of the mathematical model of PSII, which included the description of acceptor and donor sides of this photosystem.

Elaborated model of PSII had taken into account 30 states of the photosystem. The states of PSII had different number of the electrons on the acceptor side (0, 1 or 3) and the positive electric charges on the donor side (0, 1, 2, 3 or 4). Also, PSII states could contain Q_B . Possible transitions in the system, their velocity constants were found on basis of the literature data. A numerical method was used for solution of the equations system.

Investigation of PSII model had shown, that this model must include non-recombination transition between S3, S2 and S1 (S3 → S2, S2 → S1). These transitions were necessary condition for similarity with the experimental data.

Later, investigation of the model had shown, that the induction curves of the delayed luminescence (DL) had 3 phases. This phenomenon was not found for PSII model without the donor side.

Also, analysis of the model of PSII had shown, that the induction curves of DL and fluorescence (Fl) depended on intensity of light, the dark adaptation time, pH of the stroma and the kinetic parameters of the model. The simulated dependences were similar with the experimental results (qualitative similarity).

Thus, analysis of the model of PSII had shown, that non-monotonous changes of the luminescence (DL and Fl), their dependence on number of factors could be explained as result of the processes in PSII. This result is interesting for theoretical understanding of the mechanisms of functioning PSII.

P1.14

**THE SPECTRAL AND PHOTOCHEMICAL PROPERTIES
OF H(L173)L+I(L177)H MUTANT REACTION CENTER OF PURPLE
BACTERIUM *D. A6A435F7DEB: 37DA; 67E***

**Tatiana Y. FUFINA, Lyudmila G. VASILIEVA, Ravil A. KHATYPOV
and Vladimir A. SHUVALOV**

Institute of Basic Biological Problems RAS, 142290, Russia, Moscow Region, Pushchino,
Institutskaya str., 2.

E-mail: tat-fufina@yandex.ru; FAX: +7(496)733-0532

In photosynthetic organisms the conversion of light energy takes place in membrane-bound pigment-protein complex termed reaction center (RC). The bacterial RC consists of three protein subunits and 10 cofactors of electron transfer. It is known that His L173 serves as ligand to central Mg atom of BChl P_A. Using site-directed mutagenesis we have substituted the His-L173 by Leu and the Ile-L177 by His. As a result the protein micro-environment near P_A has changed, and His was repositioned 3.2 Å closer to the first ring of the tetrapyrrole. It was shown that *Rb. sphaeroides* H(L173)+I(L177)H mutant forms stable photochemical active RCs. According to our data the pigment composition of the double mutant reaction center has not changed. The data of FTIR- and low temperature absorption spectroscopy as well as E_m P/P⁺ values show that the primary donor in the mutant RC is a dimer of BChl molecules. It allows us to suggest that the His-L177 can be a Mg ligand for P_A molecule. The effect of the new ligation on the properties of the mutant RC will be discussed. This work was supported by MCB grant from Russian Academy of Sciences and by grant 06-04-48686 from the Russian Foundation for Basic Research.

**THE DECIPHERING OF THE INTERCONNECTION
BETWEEN THE STRUCTURE AND PHOTOCHEMICAL PROPERTIES
OF THE OXYGEN-EVOLVING COMPLEX OF PLANTS
(THE WAY TO A NANOTECHNOLOGY)**

N. I. SHUTILOVA

Institute of Basic Biological Problems RAS, 142290 Pushchino, Moscow Region,
Institutskaya, 2
E-mail: Shutilova-Nadezhda@rambler.ru; Fax (4967)330532;

The oxygen-evolving complex (OEC) of chloroplasts is the unique and single structure existing in the nature, in which process of photosynthetic O_2 formation is realized. Many researchers wrongly associate this complex exclusively with the Mn-cluster connected with the structure of the D1-protein of PS-2. However, the numerous investigations have showed that it is impossible to extract or synthesize the manganese-protein complex that is able to efficiently form O_2 . This process requires a more complex structure that has been forming during millions of years in the course of the evolution in the photosynthetic apparatus. This structure obligatorily includes such systems as: 1) the photochemical reaction center (RC) of PS-2, in which the energy of sunlight is used to detach electrons from primarily oxidized redox-active molecules; 2) the catalytic center of the accumulation and stabilization of oxidizing equivalents on the Mn-cluster, 3) the existence of a special reaction space for the realization of the synchronous 4-electron oxidation of two water molecules and the formation of interatomic orbitals between oxygen atoms of oxidized water molecules with the emission of O_2 in the atmosphere; 4) the systems of the deposition of electrons and protons formed during the oxidation of water molecules 5) the systems for regulating the functioning of the OEC.

We have performed the multiyear researches of the structure, properties and methods of the OEC extraction and showed that it represents the symmetric dimer of two identical pigment-lipoprotein complexes (PLPC of PS-2). In 1992 we developed for the first time the model of the molecular structure of this dimer that won recognition in the works of foreign scientists in 2001. The concept about the formation of the hydrophobic boiler of the water oxidation system that allows the screened two-anode space of the Mn-cluster to be created during the functioning of the OEC has become the principal basis of the model. The mechanism of the cyclic cooperative oxidation of water molecules and formation of oxygen has been advanced and substantiated. Analyzing the role of the molecular structures of the OEC permits us to suggest the model for a nanotechnology.

**WAVE PACKET MOTIONS COUPLED TO ELECTRON TRANSFER
IN REACTION CENTERS OF 5: >ADA&7JGE3GD3@F;35GE**

**Andrei G. YAKOVLEV¹, Tatiana A. SHKUROPATOVA²,
Lydmila G. VASILIEVA³, Anatoli Ya. SHKUROPATOV³
and Vladimir A. SHUVALOV^{1,3}**

¹Department of Photobiophysics, Belozersky Institute of Chemical and Physical Biology, Moscow State University, Moscow 119991, Leninskie Gori, MSU, bldg. A, Russian Federation

E-mail: yakov@genebee.msu.su; FAX: 495-939-3181

²Department of Biophysics, Huygens Laboratory, Leiden University, P.O. Box 9504, 2300 RA Leiden, The Netherlands

³Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region 142290, Russian Federation

Transient absorption difference spectroscopy with ~20 femtosecond resolution was applied to study the time and spectral evolution of low-temperature (90 K) absorbance changes in isolated reaction centers (RCs) of *Chloroflexus (C.) aurantiacus*. In RCs the composition of the B-branch chromophores is different with respect to that of purple bacterial RCs by occupying the B_B binding site of accessory bacteriochlorophyll by bacteriopheophytin molecule (Φ_B). It was found that the nuclear wave packet motion induced on the potential energy surface of the excited state of the primary electron donor P* by ~20 fs excitation leads to a coherent formation of the states $P^+\Phi_B^-$ and $P^+B_A^-$ (B_A is a bacteriochlorophyll monomer in the A-branch of cofactors). The processes were studied by measuring coherent oscillations in kinetics of the absorbance changes at 900 and 940 nm (P^* stimulated emission), at 750 and 785 nm (Φ_B absorption bands), and at 1020–1028 nm (B_A^- absorption band). It was shown that the immediate bleaching of the P band at 880 nm and appearance of the stimulated wave packet emission at 900 nm were accompanied (with a small delay of 10–20 fs) by electron transfer from P^* to the B-branch with bleaching of the Φ_B absorption band at 785 nm due to Φ_B^- formation. Only at a delay of 120 fs the electron transfer from P^* to the A-branch was observed with a development of the B_A^- absorption band at 1028 nm. This development was in phase with the appearance of the P^* stimulated emission at 940 nm.

**THE ELECTRON ACCEPTOR QUINONE A₁ OF PHOTOSYSTEM I
INVESTIGATED BY PULSE EPR AND ENDOR SPECTROSCOPY****Jens NIKLAS¹, Boris EPEL¹, Mikhail L. ANTONKINE^{1,2},
Sebastian SINNECKER¹, Maria-Eirini PANDELIA¹ and Wolfgang LUBITZ¹**¹Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie, Stiftstr. 34-36, 45470 Mülheim a. d. Ruhr, Germany

E-mail: antonkin@mpi-muelheim-mpg.de

²Institut für Experimentalphysik, Freie Universität Berlin, Arnimallee 14, 14195 Berlin, Germany

The quinone vitamin K₁ (VK₁) is part of the electron transfer chain in Photosystem I (protein bound VK₁ is denoted A₁). After light-induced charge separation the spin polarized radical pair P₇₀₀⁺A₁⁻ is formed. The protein bound quinone exhibits physical properties different from those of VK₁ in vitro. The X-ray structure of PS I indicates that VK₁ in the A₁ binding site is involved in asymmetric hydrogen bonding with the protein (PDB entry 1JB0).

EPR and ENDOR spectroscopy were used to investigate the light-induced radical pair P₇₀₀⁺A₁⁻ and the stationary radical anion A₁⁻ and were compared with VK₁⁻ *in vitro* [1]. One- and two-dimensional TRIPLE spectroscopy was used to determine relative orientations and signs of the hyperfine (hf) coupling tensors. Variable mixing time (VMT) ENDOR [2] was employed to determine the absolute signs of the hf coupling constants in the radical pair P₇₀₀⁺A₁⁻. We exchanged the quinone in the A₁ binding site of *menB* mutant Photosystem I with fully deuterated vitamin K₃. This allowed us to differentiate between proton hyperfine couplings from the quinone and from the protein environment. Furthermore, DFT calculations were performed on a model of the A₁ binding site, which yielded hf tensors in very good agreement with the experiment. The experimental and theoretical results clearly show that the single-sided H-bond to A₁⁻ is indeed the crucial factor that determines the specific electronic structure of this radical.

[1] Epel, B., Niklas, J., Sinnecker, S., Lubitz, W. (2006) *J Phys Chem B*, **110**, 11549–11560[2] Epel, B., Niklas, J., Antonkine, M. L., Lubitz, W. (2006) *Appl. Magn. Reson.*, **30**, 311–327

**OPTICAL AND PHOTOELECTROCHEMICAL PROPERTIES
OF PIGMENT SYSTEM MODELING PHOTOSYNTHESIS**

**Il'ya NAGOVIITSYN^{1,2}, Galina CHUDINOVA¹, Vitaly KRASOVSKII¹,
Dmitry TSCHERBAKOV², Valery SAVRANSKY¹, Gennady IONOV³,
Nikolay SMIRNOV³, Gennady SINKO³ and Gennady KOMISSAROV²**

¹Natural Science Center of A.M. Prokhorov General Physics Institute, Moscow, 119991, Vavilova str., 38, Russia

E-mail: langmuir@rambler.ru; FAX: (495)232-38-62

²N. N. Semenov Institute of Chemical Physics, Moscow, 119991, Kosygina st. 4, Russia

³Russian Federal Nuclear Centre – E. I. Zababakhin All-Russia Research Institute of Technical Physics, Chelyabinsk region, Snezhinsk, 456770, Vasilyeva st. 13, Russia

In present work Langmuir-Schaefer films of derivatives and metallocomplexes of mesotetraphenylporphyrin, octaethylporphyrin, ethioporphyrin, deuteroporphyrin, mesoporphyrin, mono-, di-, triazabenzoporphyrin were prepared and photovoltaic properties of this films were investigated. Spatial structure calculations (Gaussian 03, HyperChem) of chlorophyll *a*, pheophytin, η -carotene, mesotetraphenylporphyrin isolated molecules and chlorophyll *a* – η -carotene and mesotetraphenylporphyrin – η -carotene complexes in different molar ratios were carried out. For isolated molecules the energy of one-particle state of electron were calculated and spatial localizations of the most weakly associated electron were determined. Nonlinear optical properties (*Z*-scan measurements), absorption and fluorescence of water solution of pigment (mesotetraphenylporphyrin, η -carotene and mesotetraphenylporphyrin – η -carotene complexes with pigments molar ratios 1:1 and 1:4) adsorbed on bovine serum albumin were investigated. It was found that the interaction between mesotetraphenylporphyrin and η -carotene led to change Re03 sign as a result of energy transfer in molecular complex.

Authors would like to thank RFFI (grant No. 08-03-00875-a).

Session II:

Biochemistry and Regulation of Photosynthesis

Abstracts

T2.1

ELECTRON TRANSPORT IN PHOTOSYNTHESIS AND ITS REGULATION

A.B. RUBIN

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Department of Biophysics,
Moscow, Russia

A data on mechanisms and kinetics of electron transfer in the primary processes of photosynthesis under a wide range of temperature conditions is presented. The tunnel electron transfer in photosynthesis depends on transitions between conformational substates of protein parts of the electron carriers.

The primary stages of algal photosynthesis are regulated in such a way as to adapt cells to the environmental conditions. The goal of this regulation is to coordinate rates of light and dark reactions in chloroplast and to maintain the optimum level of cell metabolism.

Data obtained demonstrate changes in the activity of PS II as related to the regulation of the efficiency of photosynthesis in microalgae in response to the environmental factors. Changes in the functioning of PS II represent a pathway for such regulation with the key role belonging to the PQ pool.

T2.2

ROLE OF NAD(P)H:QUINONE OXIDOREDUCTASE ENCODED BY DRGA GENE IN REGULATION OF ELECTRON TRANSPORT IN THYLAKOID MEMBRANES OF THE *5K3@A435F7D;G?* *EK@75: A5KEF; ESP. PCC 6803*

**Irina ELANSKAYA¹, Victoria TOPOROVA², Vera GRIVENNIKOVA¹,
Elena MURONETS¹, Lira DAVLETSHINA¹, Eugeny LUKASHEV¹,
Kirill TIMOFEEV¹**

¹Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992, Russia;
E-mail: ivelanskaya@mail.ru; FAX: +7(495)939-11-79

²Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, 117997, Russia

Soluble NAD(P)Hquinone-oxidoreductase encoded by *drgA* gene is involved in NADPH oxidation and participates in the reduction of the quinone-type and nitroaromatic inhibitors in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Using the method of EPR spectroscopy, the kinetics of Photosystem (PS) I reaction center (P700⁺) re-reduction after its photooxidation with white light was monitored in wild type and DrgA-deficient mutant. Low rate of P700⁺ re-reduction in darkness after its oxidation in the presence of DCMU, and low rate of P700⁺ re-reduction by electrons derived from the oxidation of exogenous glucose were observed in DrgA mutant. The rate of oxygen consumption and the succinate content were lower in DrgA mutant than in wild type cells. We suggested that DrgA protein might participate in regulation of electron transport in thylakoid membranes of *Synechocystis* sp. PCC 6803 by modulation of succinate dehydrogenase activity, or might be directly involved in electron transfer from cytoplasmic respiratory substrates to plastoquinone pool.

To study the function of DrgA protein in cyanobacteria we expressed *drgA* gene in *E. coli* using expression vector pTrc-99A. Twelve histidine residues were introduced using synthetic oligonucleotide duplex. The recombinant DrgA-12His protein purified by IMAC-chromatography method and exhibiting high quinone-reductase activity was used to analyze the kinetics of P700⁺ re-reduction in isolated cyanobacterial thylakoid membranes. Added together with NADPH, the DrgA-12His protein increased the rate of photooxidized P700⁺ re-reduction in DCMU-treated thylakoid membranes isolated from the wild type and from the mutant lacking DrgA. These data indicate that DrgA protein may participate in electron transfer from NADPH to plastoquinone pool in thylakoid membranes of *Synechocystis* 6803. The role of DrgA in regulation of electron transport in thylakoid membranes of *Synechocystis* 6803 is discussed.

The work was supported by RFBR grant 06-04-48658.

T2.3

pH-DEPENDENT REGULATION OF ELECTRON TRANSPORT IN CHLOROPLASTS

**Alexey E. FROLOV, Vasilii V. PTUSHENKO, Boris V. TRUBITSIN
and Alexander N. TIKHONOV**

Department of Physics, Moscow State University, Moscow, 119992, Russia;
E-mail: an_tikhonov@mail.ru; Tel: +7-495-939-29-73

In this communication, we report results of our experimental and theoretical studies of pH-dependent regulation of photosynthetic electron transport in higher plant chloroplasts. Our major study concentrates on the plastoquinone segment of the intersystem electron transport chain and acceptor side of photosystem 1 (PS1). Light-induced redox transients of P_{700} were registered by measuring the EPR signal from P_{700}^+ , oxygen exchange processes were measured with O_2 sensitive spin probes. The intrathylakoid pH values (pH_{in}) were measured with a spin label 4-amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl accumulating inside the thylakoids in response to light-induced generation of $+pH$ [1] or pH-sensitive imidazoline- and imidazolidine-based nitroxide radicals localized in the thylakoid lumen [2]. For quantitative analysis of experimental data, we have used a mathematical model for electron and proton transport in chloroplasts, which takes into account pH-dependent activation of Calvin cycle reactions and deceleration of the intersystem electron flow caused by the light-induced acidification of the thylakoid lumen. For detailed study of the rate-limiting step of the intersystem electron transport, we performed quantum chemical calculations (PBE/3z level of density functional theory) for the reaction of proton coupled electron transfer from plastoquinol to the iron-sulfur cluster of the cytochrome b_6/f -complex. It has been shown that electron flow through PS1 is controlled by two main mechanisms: (i) acceleration of electron transfer from PS1 to $NADP^+$ due to light-induced activation of the Calvin cycle reaction, and (ii) slowing down of the intersystem electron flow on the stage of plastoquinone turnover governed by pH_{in} . According to our estimates, ATP synthesis occurs at a moderate acidification of the thylakoid lumen ($+pH \approx 1.8-2.1$). For isolated bean (*Vicia faba*) chloroplasts suspended in a medium with $pH_{out} = 7.8$, we found that $pH_{in} \approx 5.4-5.7$ in the state of photosynthetic control, and $pH_{in} \approx 5.7-6.0$ under photophosphorylation conditions.

1. B.V. Trubitsin, A.N. Tikhonov, *J. Magn. Reson.* 163 (2003) 257-269.

2. A.N. Tikhonov, R.V. Agafonov, I.A. Grigor'ev, I.A. Kirilyuk, V.V. Ptushenko, B.V. Trubitsin, *Biochim. Biophys. Acta* 1777 (2008) 285-294.

**PROPERTIES AND FUNCTIONS OF “NONCATALYTIC” SITES
OF CHLOROPLAST ATP SYNTHASE****Alexander N. MALYAN**

Institute of Basic Biological Problems RAS, Pushchino, Moscow Region, 142290,
Russian Federation
E-mail: malyan@ibbp.psn.ru; FAX: +7-096-77-317-38

Chloroplast, mitochondrial and bacterial ATP synthases (F_0F_1 -ATPases) use the transmembrane gradient of proton electrochemical potentials ($^1\mu_{H^+}$) for ADP phosphorylation. The catalytic part of ATP synthase, coupling factor F_1 , contains 3 catalytic and 3 “noncatalytic” (NS) sites. The catalytic sites function in concert, they sequentially bind substrates, form and dissociate reaction products. Decreased μ_{H^+} causes tight ADP binding to one of the catalytic sites. The binding destroys concerted functioning of these sites and induces reversible enzyme inactivation. An increase in μ_{H^+} causes ADP dissociation and enzyme reactivation. Regulation of enzyme activity through its activation/inactivation is assumed to impede nonproductive ATP hydrolysis. In the absence of energy source, isolated coupling factors of various biological origin display solely ATPase activity. Their activation/inactivation is accompanied by similar processes of ADP dissociation/association with the only difference that F_1 -ATPase activation is caused by high ATP concentration or oxianions. It was found about a decade ago that the ability of F_1 to dissociate tightly bound ADP thereby activating ATP hydrolysis depends on ATP binding to NS. If this is true for ATP synthase, then the mechanism of its regulation must be more complicated than it seemed previously. To shed light on this mechanism, the following questions have to be answered. Is there a difference between NS properties of F_1 and ATP synthase? What is μ_{H^+} effect on NS properties? What functions of ATP synthase are influenced by binding to NS of nucleotides or their analogues? An analysis of own experimental results and literature data allowed concluding that noncatalytic sites are directly involved in regulation of ATP synthase activity.

T2.5

**SPATIAL PATTERNS OF PHOTOSYNTHESIS AND PROTON
TRANSPORT IN THE EXCITABLE PLANT CELL**

Alexander BULYCHEV and Natalia KRUPENINA

Department of Biophysics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Moscow, 119991, Russia;
E-mail: bulychev@biophys.msu.ru; FAX: +7-495-939-35-03

Membrane excitation in plant cells is a multifunctional signal whose significance and pathways are not yet fully recognized. Propagation of action potentials (AP) over plants exposed to various stimuli temporally inhibits photosynthesis. Unlike higher plants, characean algae combine the properties of membrane excitation, photosynthesis, and self-organization on the cell level. Isolated characean internodes represent a unique model for studying the influence of AP on spatial patterns of proton flows, photosynthesis, and cell protection against excess light. The key event during AP is nearly a 100-fold increase in the cytosolic Ca^{2+} level. By applying pulse-modulated microfluorometry, pH microelectrodes, and other methods, several dramatic effects of AP were discovered at the plasma membrane and in the chloroplast layer. In resting *Chara corallina* cells, photosynthesis and protective non-photochemical quenching are subject to spatial patterns coordinated with the light-dependent pH banding. The generation of AP temporally extinguishes the external pH pattern, while making the heterogeneity in the chloroplast layer even more contrast. The AP induces a large transient drop in maximal chlorophyll fluorescence (energy-dependent quenching) and inhibits photosynthetic linear electron transport in chloroplasts. The effect of membrane excitation on chloroplasts is strictly light dependent and disappears upon inhibition of photosynthetic electron flow. Relations between the AP-induced quenching and electron transport were examined in the presence of electron acceptor methyl viologen (MV). This acceptor was inaccessible for chloroplast thylakoids under resting conditions, even at high (~1 mM) external concentrations. However, the generation of a single AP, made MV immediately accessible inside the chloroplasts, which was evident from irreversible non-photochemical quenching at the low irradiance range and from alterations in the kinetics of P700 photooxidation. Thus, the plasma membrane excitation inhibited native electron flow and activated electron flux to MV in a triggered mode, acting as a switch of electron transport pathways. Possible mechanisms underlying effects of AP on the plasma membrane and chloroplasts are considered.

T2.6

**LOW MOLECULAR MASS CARBONIC ANHYDRASES BOUND WITH
PIGMENT-PROTEIN PHOTOSYSTEMS COMPLEXES OF HIGHER
PLANTS**

**Lyudmila IGNATOVA, Natalia RUDENKO, Tatiana FEDORCHUK and Boris
IVANOV**

Institute of Basic Biological Problems RAS, Pushchino, Moscow region, 142290, Russia
E-mail: lkign@rambler.ru; FAX: +7-4967-33-05-32

Carbonic anhydrase is the enzyme catalyzing the reversible hydration of CO₂. In higher plants cells several carbonic anhydrases were found and the most abundant and well-studied was the soluble stromal carbonic anhydrase. It would seem that this carbonic anhydrase plays very important role in photosynthesis because the pool of inorganic carbon is stored as bicarbonate whereas the Rubisco substrate is CO₂. However, the decrease of the level of this carbonic anhydrase in transgenic plants to 1 % didn't decrease the leaf photosynthesis. Last years, the membrane-bound forms of thylakoid carbonic anhydrases became to attract attention as important for photosynthesis. We isolated from thylakoid membrane the carbonic anhydrase situated close to photosystem II or photosystem I. Molecular mass of carbonic anhydrase situated close to photosystem II was 27.5 kDa. This carbonic anhydrase possessed several unusual properties. Various sulfamides, the specific inhibitors of carbonic anhydrases had different effect on enzyme activity: acetazolamide stimulated it while ethoxazolamide inhibited even at 10⁻⁹M concentration. The activity of this protein didn't decrease at high temperature (90°C). Moreover, this activity preserved after incubation of photosystem II preparations with 1% SDS at 50°C. The protein band with carbonic anhydrase activity was observed in PAAG after SDS electrophoresis. The above facts testify to preserving the enzymatic activity after change of the structure owing to either heating or SDS treatment.

Carbonic anhydrase with apparent molecular mass about 18 kDa was found in the membrane preparations enriched with photosystem I. It was 7–10 times more active than carbonic anhydrase found in preparations of photosystem II if calculated on chlorophyll basis. This carbonic anhydrase was less sensitive to sulfamides than carbonic anhydrase of photosystem II and much more sensitive to heating.

T2.7

**THE PHOTOSYSTEM II-ASSOCIATE CAH3 IN *CHLAMYDOMONAS*
ENHANCES THE O₂ EVOLUTION RATE BY PROTON REMOVAL**

**Tatiana SHUTOVA¹, Hella KENNEWEG², Joachim BUCHTA³,
Julia NIKITINA⁴, Vasily TERENTYEV⁴, Sergey CHERNYSHOV⁵,
Bertil ANDERSSON^{1,6}, Suleyman ALLAKHVERDIEV⁴,
Vyacheslav KLIMOV⁴, Holger DAU³, Wolfgang JUNGE²
and Goran SAMUELSSON¹**

¹Department of Plant Physiology, Umeå Plant Science Centre, Umeå University, Umeå, Sweden;

E-mail: goran.samuelsson@plantphys.umu.se; FAX: +46 090 786 6676;

²Department of Biophysics, University of Osnabrück, Osnabrück, Germany;

³Department of Physics, Free University of Berlin, Berlin, Germany;

⁴Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia;

⁵Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia;

⁶Division of Cell Biology, Linköping University, Linköping, Sweden

Water oxidation in photosystem II (PSII) is still insufficiently understood and is assumed to involve HCO₃⁻. A *Chlamydomonas* mutant lacking a carbonic anhydrase associated with the PSII donor side shows impaired O₂ evolution in the absence of HCO₃⁻. The O₂ evolution for saturating, continuous illumination (R_{O₂}) was slower than in the wild type, but was elevated by HCO₃⁻ and increased further by Cah3. The R_{O₂} limitation in the absence of Cah3/HCO₃⁻ was amplified by H₂O/D₂O exchange, but relieved by an amphiphilic proton carrier, suggesting a role of Cah3/HCO₃⁻ in proton translocation. Chlorophyll fluorescence indicates a Cah3/HCO₃⁻ effect at the donor side of PSII. Time-resolved delayed fluorescence and O₂-release HCO₃⁻ measurements suggest specific effects on proton release steps but not on electron transfer. We propose that Cah3 promotes proton removal from the Mn complex by locally providing HCO₃⁻, which may function as proton carrier. Without Cah3, proton removal could become rate limiting during O₂ formation and thus, limit water oxidation under high light. Our results underlie the general importance of proton release at the donor side of PSII during water oxidation.

INTERACTION OF OXYGEN POOL WITH PLASTOQUINONE POOL IN THYLAKOID MEMBRANES**Boris IVANOV, Maria MUBARAKSHINA, Sergey KHOROBRYKH**

Institute of Basic Biological Problems, RAS, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia
E-mail: ivboni@rambler.ru; FAX: +7-496-733-05-32

The role of oxygen as an indispensable competitive electron acceptor in the reactions of electron transfer in the photosynthetic electron-transport chain is examined. Thermodynamic reasons as well as the experimental data in favour of the plastoquinone pool components interaction with the oxygen pool components are analyzed. Comparison with such interaction in the case of ubiquinone in the mitochondrial respiratory chain is made. The mechanism of participation of oxygen species as the electron acceptors in photosynthetic electron-transport chain is proposed, namely, the oxidation of semiplastoquinones and, in the main, of PSI acceptors by molecules O_2 , and the subsequent oxidation of plastoquinones by the superoxide radicals, which have formed in the both above processes [1]. The resultant reduction of molecules O_2 up to hydrogen peroxide with participation of both PSI and PQ-pool is designated as «co-operative reduction of oxygen». The biphasic kinetics of PQ-pool oxidation after switching off the light can be believed to be the demonstration that the components of this pool react with both oxygen molecules and superoxide anion radicals, and the rate of the latter reaction is higher [2]. Within framework of the proposed scheme, PQ-pool can be considered as one of elements of a protection system of the thylakoid membranes from superoxide radicals. Interaction of the plastoquinone, component of the PQ-pool, with superoxide leads to H_2O_2 production inside the thylakoid membrane [3]. Taking into account that the aggregate participation of PQ-pool in the oxygen reduction to H_2O_2 is higher than of PSI [4], and that the hydrogen peroxide is known to be a signal molecule, our results allow explaining the dependence of switching on of adaptation reactions in the plant cells on the redox-state of PQ-pool.

References

1. Ivanov B. *Biochemistry (Moscow)*, 2008, 73, 112–118.
2. Ivanov B., Mubarakshina M., Khorobrykh S. *FEBS Letters*, 2007, 581, 1342–1346.
3. Mubarakshina M., Khorobrykh S., Ivanov B. *BBA*, 2006, 1757, 1496–1503.
4. Khorobrykh S., Mubarakshina M., Ivanov B. *BBA*, 2004, 1657, 164–167.

THE REGULATION OF AMMONIUM UNCOUPLING IN CHLOROPLASTS

Vera OPANASENKO and Lilia VASJUKHINA

Institute of Basic Biological Problems, RAS, Pushchino, Moscow Region, 142290,
Russian Federation
E-mail: opanasenko@hotmail.ru, opanasenko@ibbp.psn.ru

Usually, ammonium is not considered as an endogenous regulator of chloroplast energetics because of it is not found in chloroplasts *in vitro*. But neutral ammonia freely penetrates cellular membranes; therefore, amine is easily lost during the isolation of organelles. In native cells, the content of ammonium can be quite large: in the water phase of the tomato and rape leaf tissue/apoplast the concentration of ammonium was found about 0.5–1.0 mM. We considered the uncoupling of electron transfer and ATP synthesis caused by low ammonium concentrations in pea chloroplasts. It was shown that ammonium induced two-phase uncoupling, resulting in the fall of the pH gradient. The first phase (A) was observed at ammonium concentrations 0.05 - 0.2 mM; the second one (B) was observed at 0.5-5 mM and corresponded to the classical ammonium uncoupling. The pathway A had rather low conductivity and did not induce full uncoupling at high \pm pH. The swelling of thylakoids increased the efficiency of the ammonium uncoupling; BSA-treatment decreased it.

The efficiency of the ammonium induced uncoupling was maximal in case of the PSII-mediated electron transfer from water to DBMIB, where the contribution of pathway A was more than 50 %, and minimal when electrons were transported through the entire chain. We have found two stimulators for the outflow A. Palmitic acid sharply stimulated ammonium uncoupling in PSII and PS(II+I), but in PSI this stimulation was not so effective. N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (at DCCD/Chl = 2) increased the efficiency of ammonium induced proton outflow in all the reactions measured.

It is suggested that ammonium induces two pathways of proton outflow from the lumen. The first one belongs to the protein system of soft uncoupling which activated by 0.02–0.2 mM ammonium and stimulated by endogenous decoupler - palmitic acid. 0.2–0.4 mM ammonium stimulates ATP synthesis and electron transfer in the entire chain without PA, but inhibits ATP synthesis in the presence of 0.5–1 moles palmitic acid per mole of Chl. The second pathway is activated by swelling of thylakoids.

T2.10

HYDROGEN PHOTOPRODUCTION BY PURPLE BACTERIA. PROBLEMS AND PROSPECTS

Anatoly TSYGANKOV

Institute of Basic Biological Problems RAS, Pushchino, Moscow Region, 142290
E-mail: ttt@issp.serpukhov.su; FAX: +7-0967-330532

Molecular hydrogen is being considered as clean, recyclable, and efficient future energy carrier. One problem exists: H₂ should be produced by a pollution-free and efficient process. Alternative routes of hydrogen production using renewable energy are still demanded, and biological hydrogen production is one of them.

Different microorganisms are able for hydrogen production. Purple bacteria produce hydrogen under anaerobic nitrogen deficient (or limiting) conditions using light energy. Since they have one photosystem, simple organic compounds like short-chain organic acids are used as electron donors for photosynthesis and hydrogen production. However, to put the hydrogen production by purple bacteria in practice, many efforts should be applied to eliminate many basic problems; low specific rates of the process and the source of organic electron donors are two of them.

To intensify the volumetric specific rate of hydrogen production, the immobilization of purple bacteria is widely applied. Using own and literature data this presentation will discuss problems and prospects of this method including matrix for immobilization, immobilization technology, light supplement, and a control of the process.

To solve the problem of the source of cheap electron donors an industrial wastes might be used for hydrogen photoproduction by purple bacteria. Wastes of distillery are candidates for hydrogen photoproduction by purple bacteria. Another alternative is a combination of dark fermentation of organic wastes with production of hydrogen (and organic acids as by-product), and purple bacteria producing hydrogen using light energy and fermentation broth. In this process simultaneous wastes treatment and hydrogen production incorporating sun energy will be achieved. The progress of the research will be discussed.

Acknowledgments

This work was supported by Basic Program #7 RAS, Russia

**THE PHOTOCHEMICAL AND PHOTOPHOSPHORYLATION ACTIVITY
IN CHLOROPLASTS FROM 4D3EE; 53 5: ;@7@E; EL. PLANTS GROWN
UNDER LIGHT-EMITTING DIODES WITH DIFFERENT LIGHTING
LEVELS**

**Elizaveta BASSARSKAYA¹, Olga AVERCHEVA¹, Yuliy BERKOVICH², Tatiana
ZHIGALOVA¹, Alexey EROKHIN² and Svetlana SMOLYANINA²**

¹Department of Plant Physiology, Faculty of Biology, Moscow State University,
Leninskie Gory, Moscow 119992, Russia

E-mail: venik@lighters.ru; FAX: +7-095-939-43-09

²State Scientific Centre of Russian Federation - Institute for Biomedical Problems,
Moscow, Russia

Lamps based on high-output light-emitting diodes (LEDs) are a promising artificial lighting source for growing plants. However, the influence of LED lighting on plant condition has not yet been thoroughly studied. We examined the photochemical (PCA) and photophosphorylation activity (PP) in chloroplasts isolated from the 4-th leaf of 28-day-old *Brassica chinensis* L. plants (cv. Vesnyanka). The plants were grown under red (660 nm) and blue (470 nm) LEDs with a red : blue photon ratio of 7 : 1 with a 24-hour photoperiod. The plants were illuminated with two photosynthetic photon flux levels: $391 \pm 24 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ (400 ppf) and $107 \pm 9 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ (100 ppf). Chloroplasts isolated from plants grown under high-pressure sodium (HPS) lamps with the same light intensities were used as a control.

The study has shown that in plants grown under LEDs, lower light intensity is more favorable in terms of PP. In plants grown with 400 ppf, cyclic PP measured with phenazine methosulfate, non-cyclic PP measured with $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ and the coupling of PP to electron transport (ET) were 30–50 % lower than in control plants. In plants grown under LEDs with 100 ppf, PP and P/2e⁻ were higher than in plants grown with 400 ppf under the same lighting source; they were also 2–4 times higher than in control plants and were about the same as in control plants grown with 400 ppf. Basal and PP-coupled ET activity measured with $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, as well as the Mehler reaction measured with adrenalin and glyoxylic acid, didn't differ depending on light intensity in plants grown under LEDs and was lower with 100 ppf in plants grown under HPS lamps. ET activity in PS I in plants grown under LEDs was lower with 100 ppf than with 400 ppf; in plants grown under HPS lamps it didn't differ depending on light intensity. We suggest that plants grown under LEDs with 400 ppf are suffering light stress which prevents them from effectively using light energy in photosynthesis.

P2.2

**PHOTOOXIDATION OF BACTERIOCHLOROPHYLL DIMERS
OF LH2 COMPLEXES IN THE MEMBRANES OF *3>5ž?* ;@GF;EE? G?
DEPENDING ON THE CONTENT
AND COMPOSITION OF CAROTENOIDS**

Maksim BOLSHAKOV, Zoya MAKHNEVA and Andrey MOSKALENKO

Institute of Basic Biological Problems, Pushchino, Moscow region, 142290, Russia
E-mail: lfbv22@rambler.ru; FAX: +7-4967-330532

Photooxidation of Bchl dimers of the LH2 complexes directly in the membranes is occurred under the light absorption by carotenoids. The membranes are isolated from the cells of *Alc. minutissimum* growing at different concentrations of diphenylamine (3-12 mg/l). The content of carotenoids varied from 2-7 % to 70-85 % as compared to the control. The composition of carotenoids changed simultaneously. Rhodopin and spirilloxanthin were the main carotenoids in the control. Upon reducing the carotenoids concentration up to 30-60 % the main carotenoid was neurosporene and with reduction to 2-5 % '-carotene, phytofluene and phytoene were principal.

Illumination of the membranes (carotenoids content 010±85%) by the blue light causes quick (one hour) bleaching of the dimer Bchl's band of the LH2 complex absorbed at 855 nm and the appearance of the band of Bchl oxidation product (band at 693-695 nm). This process was reduced preliminary by 2-4 times in the samples with low content of carotenoids (>5 %); photooxidation of Bchl was very low as well and was substituted by photodegradation of the pigments.

Studying heterogeneity of the LH2 complexes carotenoids' content in the samples under investigation revealed that there were three types of the complexes in the membranes isolated from the cells with inhibited synthesis of carotenoids. They were: 1. - the LH2 complexes without carotenoids; 2 - the LH2 complexes with low carotenoids content and with carotenoids from the early stages of biosynthesis; 3. the LH2 complexes with high content of carotenoids and carotenoids' composition very close to the control. If the first one was dominated in the sample (>95-99 %) the efficiency of photooxidation of the Bchl dimers of the LH2 complexes was strongly reduced. Thus, this process is practically independent of the type and the content of carotenoids in the LH2 complex.

This work was supported by RFBR grant № 48516

**REGULATION OF P700 TRANSIENTS BY THE LEVEL OF NADP(H)
IN 3DF: DAEB; D3 CELLS****Yu. V. BOLYCHEVTSEVA, I. V. TEREKHOVA¹, M. ROEGNER²
and N. V. KARAPETYAN¹**¹Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 33, 119071 Moscow, Russia

E-mail: bolychey@inbi.ras.ru; FAX: (495) 954-2732

²Department of Plant Biochemistry, Biology Faculty, Ruhr-University-Bochum, 44780 Bochum, Germany

Effects of photosynthesis, respiration inhibitors and oxygen on the electron transport in photosystem I (PSI) of the cyanobacterium *Arthrospira platensis* cells were studied. Redox transients of P700 were induced by illumination at 730 nm and monitored as kinetics of the absorption changes at 810 nm; to block electron influx from PSII, the measurements were performed in the presence of 30 μ M 3-(3,dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU). Inhibitors of terminal oxidases (potassium cyanide and pentachlorophenol) insignificantly influenced the fast oxidation of P700 under aerobic conditions, whereas removal of oxygen significantly decelerated the accumulation of P700⁺.

In the absence of oxygen the slow oxidation of P700 observed on the first far red light illumination was accelerated on each subsequent illumination, suggesting an activation of the carbon cycle enzymes. Thus, kinetics of the P700 oxidation recorded under anaerobic conditions in the presence of DCMU were caused by reactions of the carbon cycle where NADP(H) was expended and NADP⁺ was generated. In the absence of oxygen and far red light the level of NADP(H) in stroma apparently rises and there is no final acceptor (NADP⁺) for oxidation P700.

Under anaerobic conditions, potassium cyanide (an inhibitor of carbon dioxide assimilation) failed to influence the kinetics of redox transients of P700, whereas iodoacetamide (an inhibitor of NADP glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) completely prevented the photooxidation of P700 blocking NADP(H) oxidation in Calvin cycle. Thus, the fast photooxidation of P700 in the *A. platensis* cells under aerobic conditions in the presence of DCMU was caused by linear electron transport onto PSI. Slow transient changes in the P700 photooxidation under anaerobic conditions (in the presence of DCMU) were due to increasing of the NADP(H) level in the cells.

**STRUCTURE AND FUNCTION OF CHLOROPLAST AND
MITOCHONDRIA OF BARLEY (: *AD6 7G? HG>93D7L.*)
UNDER HEAT SHOCK**

**Liudmila KABASHNIKOVA, Larisa ABRAMCHIK, Galina SAVCHENKO
and Nataliya PSHYBYTKO**

Institute of Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus,
220072, Akademicheskaya str., 27, Minsk, Belarus
E-mail: photobio@biobel.bas-net.by; FAX: +375(17) 284-23-59

Effect of inhibitors of respiration (sodium azide, NaN_3) and photosynthesis (DCMU) on a structure and function state of chloroplast and mitochondria in 7-days green seedlings of barley was investigated. Suppression of photosynthetic activity of plants by DCMU was not reflected in intensity of respiration. Nevertheless, DCMU effected the incorporation of the potential-sensitive rhodamine 123 probe in mitochondria. Inhibitory of respiration by NaN_3 led to partial suppression of photosynthetic activity in barley seedlings. At these conditions decrease in an effective quantum yield of PSII (Yield) and increase in level of nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence (qN) was observed. Effect of sodium azide on photosynthetic activity of chloroplasts was accompanied by decrease of lipid peroxidation and level of soluble sugars due to diminished amount of disaccharides. Activity of cytochrome oxidase decreased approximately on 20 % in a case of NaN_3 action and practically did not change under photosynthesis inhibition by DCMU. Inhibitory action of sodium azide considerably decreased after heat treatment (400°C, 3h) of green barley seedlings whereas in the DCMU-treated leaves suppression of respiration intensity under hyperthermia was observed.

Both abscisic acid (ABA), and heat shock (HS) reduced the photosynthetic evolution of oxygen. The effect was amplified at joint action of ABA and HS, that specifies in different mechanisms of ABA and hyperthermia influence on photosynthetic function. ABA did not influence intensity of respiration in mitochondria essentially, but strengthened inhibitory HS action against structural changes of mitochondrial membranes.

ATP content estimated per one protoplast, did not change after inhibitors action, as well as exogenous ABA. The data obtained allows making the assumption, that observed effects are not connected with change of cell energy balance. The results are discussed in relation to mechanisms of chloroplast and mitochondria interaction in a plant cells under stress conditions.

P2.5

**PARTICIPATION OF ADENYLATE KINASE OF THE CHLOROPLASTS
IN REGULATION OF ENERGY EXCHANGE**

I.M. KARTASHOV and E.N. MUZAFAROV

Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, Pushchino,
Moscow region, Russia 142290
E-mail: Kartashov@issp.serpukhov.su; FAX: 7(4967)33-05-32

It has been analyzed principal possibility of participation of adenylate kinase in regulation of diffusion of adenine nucleotides in the chloroplasts. For this purpose it has been studied the influence of adenylate kinase on the rates of the synthesis of gluco-6-phosphate and on the reduction of ferricyanide at phosphorylation in the system containing chloroplasts, hexokinase and ADP in low concentration.

In this instance, in diffusion mode of phosphorylation functioning principal possibility of increasing the rate of ATP transfer from the chloroplasts to hexokinase with participation of adenylate kinase has been ascertained. The results of experiments have been discussed within the model according to which it is supposed that in chloroplasts at the level of functioning of adenylate kinase via direct and reverse bond of the shuttle type it is possible to regulate adenine nucleotides and to control ATP regeneration relative to its requirements in connection with other regulation mechanisms. In this case feedback control is made due to the regulation effect of ADP on catalytic activity of CF_1 , entering from adenylate kinase. In favor of model application experimental data are given on localization of adenylate kinase in the chloroplasts, regulation of its activity with natural inhibitors and phytohormones, participation in adaptation of the plants to different environmental factors that testifies its probability. As data obtained by us show changes of adenylate kinase activity of the chloroplast can include both stimulation and inhibition. Such dual regulation of reciprocal effect is well agreed with general principals of regulation of physiological photosynthetic systems.

P2.6

**RENATURATION OF THERMOSTABLE HYDROGENASE HYDSL
DERIVED FROM THE PURPLE SULFUR PHOTOTROPHIC BACTERIUM
F. ;A53BE3 DAE7AB7DE; 5; @3 USING HETEROLOGOUSLY EXPRESSED
SUBUNITS**

**A.N. KHUSNUTDINOVA, G.N. SHIRSHIKOVA, O.A. POSTNIKOVA, H.A.
BATYROVA, A.M. BOUTANAEV and A.A. TSYGANKOV**

Institute of Basic Biological Problems RAS, Institutskaya st., 2, Pushchino, Moscow
region, 142290, Russia.
E-mail: hvosta@gmail.com; FAX: (4967)330532

The purple sulfur phototrophic bacterium *Thiocapsa roseopersicina* BBS contains several Ni-Fe hydrogenases. One of two membrane-bound hydrogenases is remarkably stable. However, its investigation and usage is limited by the availability of the protein. The Ni-Fe hydrogenase HydSL assembly includes the concordant expression of two structural genes (hydS and hydL) as well as a number of accessory genes, participating in the maturation process of this enzyme.

The hydSL genes are expressed on the very low level in *Thiocapsa roseopersicina* that makes difficult both basic and applied investigations. One possibility to increase HydSL yield might be recovering of the active enzyme from its purified subunits.

Firstly, we overexpressed both hydS and hydL genes in *E. coli* cells and partially purified each subunit from inclusion bodies. Following this, we carried out a number of experiments on in vitro renaturation of the HydSL hydrogenase from its HydS and HydL constituents. Our preliminary data showed that recovered enzyme evolved hydrogen on a low level and that the evolution was not due to the background of the *E. coli* hydrogenase activity.

RELATIVE CONTRIBUTIONS OF FERREDOXIN AND MEMBRANE-BOUND CARRIERS TO OXYGEN REDUCTION**M.A. KOZULEVA and Boris IVANOV**

Institute of Basic Biological Problems, RAS, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia
E-mail: kozuleva@gmail.com; FAX: +7-496-733-05-32

The oxygen reduction, the electron transfer to oxygen, is the alternative pathway of photosynthetic electron transport, with its share amounting to 30 % from total electron transport in the optimal conditions for CO₂ assimilation *in vivo*. The immediate reductants of O₂ are still unclear. Ferredoxin (Fd), autooxidizable small (12 kDa) stromal protein, is traditionally thought as the essential oxygen reductant, although the rate constant of the reaction of Fd with O₂ molecules is not high. Since the membrane-bound carriers of Photosystem I acceptor side as well as the plastoquinone can be the O₂ reductants, it is possible that there are several concurrent sinks to oxygen in the photosynthetic electron-transport chain (PETC). We compared the Fd-dependent oxygen reduction rate, measured as the rate of Fd oxidation by oxygen, with the total rate of the electron flow to oxygen. The latter was found from the measurements of either the oxygen concentration change or Photosystem II quantum yield. The results derived from both methods are closely agreed.

In the absence of NADP⁺ the Fd-dependent oxygen reduction amounted to 70–80 % in weak light and 40–60 % in strong light, of total electron flow to oxygen. The rate of Fd-dependent oxygen reduction was not affected by light intensity, so the decrease of its share could be explained by the increase, with the increasing of light intensity, of electron flow to O₂ from membrane-bound carriers situated in PETC 'before' ferredoxin. These data are in accordance with our data that the hydrogen peroxide formation inside membrane in strong light is larger than in weak light. The contribution of Fd-dependent oxygen reduction to the total oxygen reduction decreased to 5–10 % in the presence of NADP⁺. These data are the first quantitative estimation of the ratio of concurrent electron flows to O₂.

The existence in PETC of some concurrent pathways leading to generation of hydrogen peroxide, the main signal agent in the plant cell, and the possibility of their variation can be the basis to signalling about the different PETC states under various environment conditions.

**ACTION POTENTIAL AFFECTS THE PHOTOSYNTHETIC PATTERN OF
5: 3D3 5AD3>> ;@3CELL****Natalia KRUPENINA¹, Alexander BULYCHEV¹, Rob ROELFSEMA²
and Ulrich SCHREIBER²**¹Biophysics Department, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russia

E-mail: kamzolkina-n@yandex.ru; FAX: +7(495)939-11-15

²Department of Botany I, Julius-von-Sachs Institute, University of Würzburg, 97082, Würzburg, Germany

Characean algae are considered close relatives of land plants, and are suited perfectly for studying relations between photosynthesis and proton flows. Upon irradiation with photosynthetically active light, cells of *Chara corallina* produce coordinated spatial patterns of chlorophyll fluorescence and extracellular pH. In the resting cell the periodic pH profile is parallel to the profile of non-photochemical quenching (NPQ) and antiparallel to that of effective photosystem II quantum yield ($\pm F/F_m'$). Photosynthesis is higher in the acid zones compared to alkaline zones. Our previous measurements demonstrated that electrically-induced action potential (AP) smoothes the pattern of extracellular pH and differentially suppresses photosynthesis in the alkaline and acidic regions of *Chara* cells. Based on the observations of stronger AP-induced quenching in alkaline than in acidic zones, we suggested that the pattern of photosynthetic electron flow, unlike the pH profile, is not smoothed after AP but becomes even more pronounced. In this work, we examined the effects of *Chara* cell excitation on images of $\pm F/F_m'$ and NPQ with high resolution Imaging-PAM technique. The Imaging-PAM Maxi-version provides imaging of large scale samples like *Chara corallina*, measuring 0.9 mm in diameter and up to 8–9 cm in length. The results of this study suggest that AP generation enhances the banding patterns of NPQ and photosynthetic electron transport in the chloroplast layer. The observation that AP generation intensifies the separation of chloroplast layer into areas with high and low photosynthesis adds to the list of documented phenomena induced by propagating electric signals in plants. These include changes in osmotic and turgor pressure, rapid leaf movements, stimulation of respiration, induction of proteinase inhibitor synthesis, temporal inhibition of the H⁺ pump and high pH channel activity. The significance of AP as a multifunctional signal is thus emphasized. We discuss the transient changes in pH-banding, effective quantum yield and non-photochemical quenching in relation to alterations in intracellular Ca²⁺ and H⁺ concentrations during and after AP.

P2.9

**EFFECTS OF OXYGEN ON LIGHT-INDUCED REDOX TRANSIENTS
OF P_{700} AND CHLOROPHYLL FLUORESCENCE IN C_3 -LEAVES**

**Ilya V. KUVYKIN, Alexey V. VERSHUBSKIY, Vasily V. PTUSHENKO
and Alexander N. TIKHONOV**

Faculty of Physics, M.V. Lomonosov Moscow State University, 119992, Moscow, Russia
E-mail: gwqw@mail.ru; Tel: +7-495-939-29-73

In this work, we have studied regulation of photosynthetic electron flow through photosystem 1 (PS1) in C_3 -plant leaves (*Hibiscus rosa-sinensis* and *Vicia faba*). Using EPR and PAM-fluorimetry methods, we investigated the influence of illumination pre-history and effects of atmospheric gases (O_2 , CO_2) on P_{700} redox transients and slow induction of chlorophyll fluorescence. It has been demonstrated that the depletion of oxygen from the leave atmosphere have a substantial influence on the photosynthetic electron transport in intact chloroplasts. Under anaerobic conditions, a steady-state concentration of oxidizes centers P_{700}^+ is considerably lower than under aerobic conditions. Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence also diminishes with depletion of oxygen, indicating a decrease in the transthylakoid pH gradient (ΔpH). For quantitative analysis of experimental data, we used a mathematical model for electron and proton transport in chloroplasts, which takes into account alternative pathways of electron flow and pH-dependent regulation of intersystem electron transport. According to our estimates, in *Hibiscus rosa-sinensis* electron flux from PS1 to O_2 under quasi steady-state conditions comprises ≈ 40 % of the total electron flux through PS1. A decrease in the level of P_{700}^+ under anaerobic conditions can be caused by two reasons: *i*) the over-reduction of the acceptor side of PS1 due to deceleration of electron efflux from PS1, and *ii*) the release of photosynthetic control caused by a decrease in ΔpH . In the meantime, we did not observe any stimulation of cyclic electron around PS1 that might be expected under anaerobic conditions due to redistribution of electron fluxes on the acceptor side of PS1.

**EFFECTS OF PRE-ILLUMINATION ON CHLOROPHYLL
FLUORESCENCE OF *FD36 7E53@F*; 3LEAVES**

**Ilya V. KUVYKIN¹, Vasily V. PTUSHENKO^{1,2}, Ludmila V. OZEROVA³,
Sergey KISELEV³, Olga P. SAMOYLOVA² and Alexander N. TIKHONOV^{1,2}**

¹Department of Biophysics, Faculty of Physics, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119992, Russia
E-mail: gwqw@mail.ru; Tel: +7-495-939-29-73

²Institute of Biochemical Physics, Moscow, Kosygina st., 4.

³Main Botanical Gardens of the Russian Academy of Sciences, 127276, Moscow, Botanicheskaya st., 4

In this work, we have compared fluorescence characteristics of *Tradescantia* leaves of different species: *Tradescantia albiflora* Kunth (the humid tropics of South America), *T. fluminensis* Vell (the tropics of America from Central America to Argentina), *T. navicularis* Ortg. (Mexico and Peru) and *T. sillamontana* Matude (north-east of Mexico). We focused our study on the influence of illumination conditions during plant growth and effects of plant adaptation to the light or to darkness on the fluorescence parameters (fast and slow induction of fluorescence, photochemical and non-photochemical quenching of fluorescence) of leaves in vivo. For all the species studied in our work, photochemical quenching (Q_p) of chlorophyll fluorescence in plants grown under a high light illumination (10–20 klx) was more intensive as compared to plants grown at low light intensity (0.3–0.5 klx). In contrast to photochemical quenching, non-photochemical quenching (NPQ) of chlorophyll fluorescence in plants grown at high light intensity is less significant than in plants grown at low light intensity. Dark adaptation (about 60–80 min) of plants grown under high light conditions leads to a decrease in Q_p and an increase in NPQ. Light adaptation of *T. albiflora* и *T. fluminensis* grown at dim light leads to a decrease in NPQ and an increase in Q_p ; light adaptation of *T. navicularis* and *T. sillamontana* leads to an increase in both components of fluorescence quenching. The data obtained are discussed in the context of the problem of photosynthetic apparatus adaptation to variable conditions of illumination.

УМЕНЬШЕНИЕ СКОРОСТИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КИСЛОРОДА В ХЛОРОПЛАСТАХ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ В ПРОЦЕССЕ ЗАКАЛИВАНИЯ

Галина ЛЫСЕНКО¹, Валентина ГИНС²

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119330, Россия
E-mail: g_lysenko@mail.ru

²ВНИИ селекции и семеноводства овощных культур РАСХН, Одинцово, Москва

В фотосинтетической электрон-транспортной цепи в первой (низкие положительные) и второй (небольшие значения отрицательной температуры) фазах закаливания сохранялся транспорт электронов на кислород как дополнительный по сравнению с НАДФ акцептор электронов. При этом не наблюдалось возрастания скорости переноса электронов на кислород в ФС 1 и ФС 2. Следовательно, несмотря на достаточно высокую концентрацию кислорода в хлоропластах (вследствие его выделения из воды), в них не происходило увеличения генерации активных форм кислорода и не создавались условия, приводящие к возникновению фотоокислительного стресса. В первой фазе закаливания наблюдалась более высокая степень разобщения переноса электронов на кислород в ФС 1 по сравнению с НАДФ и феррицианидом калия. Возможно, это связано с тем, что скорость пассивного выхода протонов (passive proton leakage) из внутритилакоидного пространства наружу оказывает дополнительное регулирующее действие на акцептирование электронов кислородом в ФС 1 по сравнению с другими акцепторами. Подготовка растений к зимним условиям существования связана с перестройкой в липидном составе мембран хлоропластов и повышением их гидрофобности, что приводит к уменьшению величины диффузионной составляющей протонной проводимости тилакоидной мембраны, и как следствие, уменьшению процесса восстановления кислорода. В абсолютных величинах скорости нециклического и псевдоциклического транспорта электронов с различными акцепторами оказались близкими у сортов озимой пшеницы Заря и Полесская 70 на первой и второй фазах закаливания и при действии разобщителя NH_4Cl . Это позволяет считать, что полученная нами тенденция отражает общую закономерность приспособительной реакции растений озимой пшеницы к низкой температуре.

P2.12

ОДНОВРЕМЕННОЕ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЕ КИСЛОРОДА ДО СУПЕРОКСИДНОГО АНИОН-РАДИКАЛА И ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В ХЛОРОПЛАСТАХ ГОРОХА

Галина ЛЫСЕНКО

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, 119330, Россия
E-mail: g_lysenko@mail.ru

Генерация активных форм кислорода в хлоропластах на свету, прежде всего, обусловлена восстановлением кислорода в электрон-транспортной цепи. Нами обнаружено восстановление кислорода до пероксида водорода, которое осуществляется одновременно и параллельно восстановлению кислорода в ФС1 до супероксидного анион-радикала, регистрируемого в присутствии адреналина. Так, при освещении изолированных хлоропластов в отсутствие экзогенных акцепторов электронов наблюдалось небольшое эндогенное поглощение кислорода. При добавлении адреналина, взаимодействующего с супероксидным анион-радикалом в ФС 1, поглощение кислорода на свету значительно увеличивалось. Однако при последующем внесении в эту систему каталазы в темноте регистрировалось одномоментное выделение кислорода, что указывало на образование пероксида водорода одновременно с окислением адреналина супероксидом. Данная серия экспериментов проводилась при рН 7,4, что полностью исключало возможность образования пероксида водорода при окислении самого адреналина. При повторном включении света величина поглощения кислорода в этой системе была значительно ниже, по-видимому, в результате разложения образующегося пероксида каталазой. Далее для удаления пероксида водорода в этой системе была создана этанол-каталазная ловушка (путем добавления этанола). В ее присутствии поглощение кислорода усилилось. При этом величина наблюдаемой стимуляции значительно превышала скорость поглощения кислорода на свету при полном разложении пероксида водорода под действием экзогенной каталазы и превышала величину поглощения кислорода в присутствии одного адреналина. Суммирование интенсивности двух транспортов электронов на кислород с образованием супероксида и пероксида водорода наблюдалось в широком диапазоне значений рН от 7,2 до 8,2, причем опытная величина полностью соответствовала теоретически рассчитанной, исходя из величин, получаемых при раздельной регистрации скоростей тока электронов на кислород в присутствии адреналина и этанол-каталазной ловушки.

**OXYGEN AS THE ELECTRON ACCEPTOR IN WHEAT CHLOROPLASTS
UNDER DROUGHT STRESS****Galina LYSENKO, Irina STRIZH**

Plant Physiology Department, Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory d.1, k.12, 119992, Moscow, Russia
E-mail: irina.strizh@mail.ru; FAX: +7(495)9394309

Several lines of evidence suggest that water deficit induce the allocation of photosynthetic electrons to O_2 particularly in wheat (*Triticum aestivum* L.) [1]. We have found that electron transport activity in the whole photosynthetic electron transport chain (PETC) slightly increased in drought-resistant wheat cultivar Saratovskaya 29, but decreased in drought non-resistant cultivar Opal under drought stress. However the electron transport activity of photosystem (PS) I and PS II were decreased in both cultivars. An increase in the whole electron transport rate when both photosystems decrease their activity may be caused by more effective reoxidation of plastoquinone (PQ) pool. The reoxidation of PQ-pool could be promoted particularly by O_2 photoreduction. Indeed, it was found that oxygen photoreduction with H_2O_2 generation increases significantly in drought-resistant wheat, but decreases in the sensitive cultivar under drought stress. On contrary, the PS I associated Mehler reaction that result in superoxide generation decreases in the resistant cultivar and stays constant in the sensitive one. Summarizing several independent studies of the O_2 photoreduction in plants, growing under different environmental conditions that result in osmotic stress, the conclusion was made that the superoxide formation in PS I locality is a disadvantage, whereas slight increasing of the H_2O_2 generation in thylakoids may be related to the plant stress tolerance [2]. It is supposed that O_2 photoreduction in PETC may drain the reduced equivalents overproduction in chloroplasts under drought stress and participate in water balance regulation, whereas H_2O_2 may initiate various signaling pathways. Strikingly opposite effect of the drought stress on O_2 photoreduction in two wheat cultivars may results from the different intramembrane changes occurring in thylakoids under water deficit.

[1] Biehler K., Fock H. Evidence for the contribution of the Mehler-peroxidase reaction in dissipating excess electrons in drought-stressed wheat. *Plant Physiol.* 1996. V. 112. P. 265–272.

[2] Strizh I. The Mehler reaction as an essential link between environmental stress and chloroplast redox signaling. In: Allen JF, Gantt E, Golbeck JH, Osmond B eds. *Photosynthesis. Energy from the Sun. Proceedings of the 14th International Congress on Photosynthesis.* Springer, Heidelberg. 2008. P. 1349–1352.

COMPARISON OF LIGHT DEPENDENCE OF NITRATE UPTAKE IN FREE LIVING GREEN ALGAE 5: >AD7>>3 AND SYMBIOTIC GREEN 3>937 FD74AGJ;3

Elena PAVLOVA and Alexander MASLOV

Institute of Basic Biological Problems RAS, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia
E-mail: helen@ibbp.psn.ru; FAX: +7-496-733-05-32

The connection of photosynthesis with the nitrate uptake was compared in photosynthesizing free living green algae *Chlorella sp.K*, and lichenized symbiotic green algae *Trebouxia*. In *Chlorella* light was shown to promote nitrate assimilation. DCMU completely inhibited the nitrate uptake by the cells. At high light intensities and CO₂ concentrations saturating photosynthesis nitrate promoted O₂ evolution. The isolated highly purified alga *Trebouxia* did not assimilate nitrate from exogenic solutions. The purification procedure itself did not change the rates of photosynthesis and respiration as compared to intact thallus. It demonstrated the intactness of algal cells after purification and incubation with nitrate. Mycobiont and thallus fragments containing both bionts assimilated nitrate with illumination showing no essential influence on the rate of uptake. DCMU, inhibitor of photosynthetic electron transport, had only a minor effect on the uptake rate, although it completely blocked oxygen evolution by the photobiont. The absence of nitrate uptake detected spectrophotometrically was confirmed by the mass-spectroscopic measurements. Incubation of purified algal cells in solution of Na¹⁵NO₃ did not noticeably enrich cells with ¹⁵N either in the light or in the dark. In contrast, the intact thallus of lichen had substantial enrichment with ¹⁵N isotope under the same conditions. This data imply the absence of direct connection of nitrate assimilation to photosynthetic electron transport, unlike in the free-living green algae where nitrate assimilation is directly coupled with photosynthesis.

FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF PHOTOSYSTEM II IN THE DARK GROWN $\Delta psbO$ MUTANT 5: $\Delta psbO$ K6A? A@3ED7; @: 3D6F;;

Alexey PIGOLEV, Sergey ZHARMUKHAMEDOV and Vyacheslav KLIMOV

Institute of Basic Biological Problems, Pushchino, Moscow region, 142290, Russia;
E-mail: alexey-pigolev@rambler.ru; FAX: +7-0967- 330532

Inactivation of the *psbO* gene in higher plants and the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* prevents the assembly of stable Photosystem II (PSII) complex [1-3]. On the other hand $\Delta psbO$ strain cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 could grow photoautotrophically and assemble active water-oxidizing complex (WOC), although it was more sensitive to photoinduced damage [4]. Since one of the reasons of PSII instability in $\Delta psbO$ -mutants of eukaryotes could be photoinactivation we studied characteristics of PSII complex in the dark grown *psbO*-deficient mutant of green alga *C. reinhardtii*. It was found that grown under heterotrophic conditions (dark + acetate) $\Delta psbO$ mutant cells of *C. reinhardtii* were capable of assembling stable, photochemically-competent reaction centres of PSII (that was confirmed by immunological analysis of D1 protein level, pigment content and photoinduced changes of PSII chlorophyll fluorescence yield) while O_2 -evolution activity was not revealed. The ratio F_v/F_m of the dark grown $\Delta psbO$ mutant *C. reinhardtii* was 0.37 compared to 0.56 of the dark grown wild type cells. The OI DP rise of the induction curve, measured on the dark grown $\Delta psbO$ *C. reinhardtii* cells, showed a marked decrease in the rate of the electrons donation from the WOC to PSII reaction centre. The dark decay of the F_m in the presence of DMCU (reflecting charge recombination between Q_A^- and the oxidized components of the PSII donor side) was retarded in the mutant. In addition the kinetics of $\Delta psbO$ -mutant F_m dark relaxation was characterized by the appearance of a transient fluorescence increase, which was also seen in thermoinactivated or hydroxylamine treated wild type cells.

The data obtained indicate that the dark grown *psbO*-deficient cells of *C. reinhardtii* are able to form stable, photochemically-active PSII reaction centre, unable to oxidize water due to probable defects in the assembly of the manganese cluster.

1 Yi X., McChargue M., Laborde S., et al. (2005) J. Biol. Chem., 280, 16170–16174.

2 Mayfield S.P., Bennoun P., Rochaix J.D. (1987) EMBO J., 6, 313–318.

3 De Vitry C., Olive J., Drapier D., et al. (1989) J. Cell Biol., 109, 991–1006.

4 Burnap R.L., Sherman L.A. (1991) Biochemistry, 30, 440–446.

**VISUALIZATION OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL
HETEROGENEITY IN 3@F: A57DAECHLOROPLAST****Marina PIKULENKO¹, Natalia KRUPENINA²
and Alexander BULYCHEV²**

¹EcoCenter MSU, Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russia
E-mail: pikulenkomarina@mail.ru; Tel/Fax: +7(495)932-89-82

²Biophysics Department, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991, Moscow, Russia

The balance between photochemical utilization of light energy and thermal losses of excessive excitations in plants is maintained by a variety of mechanisms. The regulatory protective mechanism known as nonphotochemical quenching (NPQ) of chlorophyll excitations is normally activated under continuous illumination at high photon flux densities. The analysis of chlorophyll fluorescence provides considerable information, including the efficiency of charge separations in photosystem II (PSII). Our previous measurements demonstrated that, in cells of a hornwort *Anthoceros*, strong nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence develops in the dark after a short (1–3 s) pulse of intense light. The light-triggered quenching of maximum fluorescence F_m , measured on microscopic regions of *Anthoceros* thalli with a pulse amplitude modulated Microscopy-PAM fluorometer (Walz, Germany), developed within 0.5–1 min after the actinic light pulse and relaxed gradually in the subsequent 10–15 min. The light pulse-triggered F_m changes occurred in parallel with changes in minimal fluorescence F_o , as monitored with weak modulated light. Interestingly, the light-triggered quenching of F_m and F_o fluorescence developed concurrently with but slower than regenerative changes in cell membrane potential recorded with capillary microelectrodes. In this work, we examined images of PSII photochemical efficiency ($\pm F/F_m'$) and NPQ in *Anthoceros* cells with high resolution Imaging-PAM technique. The observations made with conventional (transmitted light) and fluorescence microscopy revealed the structural and photosynthetic heterogeneity within individual chloroplasts of *Anthoceros* cell. Hornworts (*Anthocerotae*) are the group of land plants with pyrenoid-containing chloroplasts. It appears that heterogeneous pattern of NPQ within the chloroplast is attributed to the presence of pyrenoid, characteristic of *Anthoceros* genus. Since pyrenoids are known to be enriched in Rubisco content, one may assume that the NPQ pattern at the chloroplast level reflects different photochemical activities of PSII in the chloroplast regions differing in capacity of carbon fixation.

P2.17

**PROTECTIVE EFFECT OF BICARBONATE AGAINST EXTRACTION
OF THE EXTRINSIC PROTEINS OF THE WATER-OXIDIZING COMPLEX
FROM PHOTOSYSTEM II MEMBRANE FRAGMENTS**

Olga V. POBEGUTS, Tatiana N. SMOLOVA and Vyacheslav V. KLIMOV

Institute of Basic Biological Problems RAS, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia
E-mail: nikitishena@mail.ru; FAX: +7-496-7-33-05-32

A protective effect of bicarbonate (BC) against extraction of the extrinsic proteins, predominantly the Mn-stabilizing protein (PsbO protein), during treatment of Photosystem II (PS II) membrane fragment from pea with 2 M urea, and at low pH (using incubation in 0.1 M glycine-HCl buffer, pH 3.5 or 0.5 M citrate buffer, pH 4.0–4.5) was detected. It was shown that the extraction of the proteins with Mw 24 kDa (PsbP protein) and 18 kDa (PsbQ protein) by the use of highly concentrated solutions of NaCl does not depend on the presence of BC in the medium. An optimal concentration of BC at which it produces the maximum protecting effect was shown to be between 1 mM and 10 mM. The addition of formate did not influence the protein extraction but it reduced the stabilizing effect of BC. Independence of the stabilizing effect on the presence of the functionally active Mn within the water-oxidizing complex indicates that the protecting effect of BC is not related to its interaction with Mn ions. The fact that there is a preferable sensitivity of the PsbO protein to the absence of BC in the medium during all the treatments makes it possible to suggest that either BC interacts directly with the PsbO protein or it binds to some other sites within PS II and this binding facilitates the preservation of the native structure of this protein.

**INFLUENCE OF HEAVY METAL IONS ON DARK RELAXATION
KINETICS OF VARIABLE CHLOROPHYLL FLUORESCENCE
IN CHLOROPLASTS**

Oleksandr POLISHCHUK, Nataliya TOPCHIIY and Elena ZOLOTAREVA

M.G. Kholodny Institute of Botany, Kiev, Tereshchenkivs'ka St. 2, 01004 Ukraine
E-mail: polishch@yandex.ru; FAX: +38-044-272-32-31

Increased levels of heavy metals induce significant impairment of photosynthesis in most higher plants. The most probable points of their application are enzymes of the Calvin cycle[1], donor and acceptor side of photosystem II – the most vulnerable part of photosynthetic machinery[2]. In order to test heavy metal action at the acceptor side of photosystem II, we investigated changes in chlorophyll fluorescence relaxation kinetics in response to heavy metals addition. Class B chloroplasts were isolated from 2 week pea (*Pisum sativum* cv. Uladovski) seedlings, washed with 0.5 mM EDTA in suspension buffer and then washed out of EDTA three times. Reaction mixture contained 100 mM sorbitol, 10 mM NaCl, 10 mM tris-HCl and chloride of heavy metal. Samples were preincubated for 5 min in the dark after transferring to cuvette. Fluorescence was recorded with Xe-PAM fluorometer for 60 s after 1 s saturating flash (11000 $\mu\text{mol quanta/m}^2\text{s}$). In most cases curves decomposed into three exponential phases. The first phase was strongly associated with electron transport. Zn(II), Cd(II) and Pb(II) increased amplitude of the slow component and decelerated intermediate and fast components. Cu (II) (50–200 μM) and Hg(II) (5–20 μM) showed, unexpectedly, completely different mode of action. They caused pronounced acceleration of fast and intermediate components and amplitude increase of the fastest at the expense of intermediate and slow component. This finding agrees with our previously obtained data [3] and may account for high vulnerability of proton uptake reaction to Cu (II). We conclude that acceptor-like action of Cu(II) and Hg(II) is related to conformational changes in photosystem II induced by heavy metal binding. Moreover, it seems that Cu (II) and Hg (II) facilitate electron flow from Q_A^- at least in dark-adapted chloroplasts.

1. Z. Krupa, Ö. Gunnar, N. P. A. Huner, *Physiol. Plantarum* (1993) v.88 p. 626–630.

2. M. Baron, J. B. Arellano and J. L. Gorge, *Physiol. Plantarum* (1995) v.94, p.174–180

3. Полищук А.В., Золотарева Е.К., *Биофизика* (2007) т.52, № 5 с.715–722.

P2.19

**MODIFICATION OF THE HYDSL HYDROGENASE
FROM THE PURPLE SULPHUR PHOTOTROPHIC BACTERIUM
F. ;A53BE3 DAE7AB7DE; 5; @3 BY HIS-TAGGING C-END
OF ITS SMALL SUBUNIT**

**POSTNIKOVA O.A., KHUSNUTDINOVA A.N., SHIRSHIKOVA G.N.,
BATYROVA H.A., TSYGANKOV A.A. and BUTANAIEV A.M.**

Institute of Basic Biological Problems RAS, Institutskaya st., 2, Pushchino, Moscow
region, 142290, Russia
E-mail: lelik985@rambler.ru; FAX: (4967)330532

The HydSL hydrogenase derived from *Thiocapsa roseopersicina* is a good candidate for research in hydrogen energy production. The enzyme is highly oxygen tolerant and extremely thermostable. The immobilization of HydSL on a hydrogen electrode seems to be one of the promising approaches in fuel cell technology. Modern technique of hydrogenase immobilization includes co-polymerization of poly-pyrrolviologen as a mediator of electron transfer between hydrogenase and electrode. The current density of electrodes prepared in this way is less than 1 mA/cm², what is far from practical value (100mA/cm²). The oriented immobilization of hydrogenase might facilitate direct wiring of the electrode surface and hydrogenase active center. The oriented immobilization of hydrogenase might facilitate direct wiring of the electrode surface and hydrogenase active center.

One possibility is to use His-tagged enzyme for this purpose. Keeping this in mind, we obtained *T. roseopersicina* strain with modified HydSL hydrogenase by His-tagging C-end of its small subunit, HydS. Interestingly, thermostability of the modified protein has been decreased as the preliminary studies had shown. Detailed characterization of the modified enzyme as well its comparing with the native one will be discussed.

PROTOCHLOROPHYLLIDE RESYNTHESIS AND CHLOROPHYLLIDE ESTERIFICATION IN POSTETIOLATED BARLEY LEAVES TREATED WITH CAROTENOID BIOSYNTHESIS INHIBITOR NORFLURAZON**Valentina RASSADINA and Illja KORAN**

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Akademicheskaya 27, Minsk, 220072, Belarus
E-mail: valentina_rassadina@rambler.ru; FAX: +375-0172-84-23-59

Carotenoids play roles of accessory pigments for light harvesting and protective compounds against photodamage. The polar forms of pigments may stabilize the chloroplast membranes by interacting with the hydrophilic heads of matrix lipids, thus increasing their thermostability and resistance to certain stress conditions. Treatment of higher plants with norflurazon results in the inhibition of phytoene desaturation and phytoene accumulation in the plastid membranes. The incorrect insertion of non-polar forms of carotenoids may destabilize membrane structure and functionality.

The esterification of chlorophyllide (Chlide) is necessary for the incorporation of chlorophyll (Chl) into pigment-protein complexes. About 12–15 % of the Chlide produced by full protochlorophyllide (Pchlide) photoconversion is esterified during the rapid phase (about 30 s), while esterification of the residual Chlide proceeds slower (about 20 min). A rapid phase of Chlide esterification in flash-irradiated etiolated barley seedlings has been proposed to result from complex between 8 POR and 1 Chl synthase preloaded with tetraprenyl diphosphates. Recently a correlation was observed between the Chlide esterification, Shibata shift and Pchlide650 regeneration. This suggests that the kinetics of Chlide esterification, Pchlide650 regeneration and Pchlide resynthesis *de novo* in re-etiolated plants are due to the specific spatial arrangement of POR, Chl synthase and most probable the Pchlide producing enzyme, Mg cyclase, within prothylakoid membranes. Thus, it is possible that the carotenoids and lipids located in the plastid membrane allow the close spatial location of the enzymes and the interconnected regulation of the first and the last steps of Chl biosynthesis pathway.

In this work the Pchlide resynthesis and Chlide esterification in etiolated barley leaves with impaired carotenogenesis due to treatment with norflurazon have been investigated. It was demonstrated that carotenoid deficiency influences pigment composition, including amount and ratio between photoactive and nonphotoactive Pchlide, amount of resynthesizing Pchlide and kinetics of Chlide esterification. The results are discussed in relation to the influence of carotenoids on spatial arrangement and functionality of POR and Chl synthase complex within plastid membranes.

This work was supported by the Belorussian Foundation for Basic Research (Б07MC-038).

P2.21

CHLOROPHYLL A FLUORESCENCE AND SOME BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF SUGAR BEET PLANT LEAVES IN NORM AND EFFECTS OF GLUCOSE EXCESS

A.K. ROMANOVA, V.A. MUDRIK, A.R. IGNAT'EV, N.S. NOVICHKOVA and B.N. IVANOV

Institute of Basic Biological Problems RAS, Pushchino, Moscow region, Institutskaya ul., bld. 2, 142290, Russia
E-mail: romanova@issp.serpukhov.su; FAX: 7(4967) 330532

This work is a part of serial investigations of mechanism of plant acclimation to elevated CO_2 ($e\text{CO}_2$) in the air. The moment of acclimation appearance could not be forecasted exactly. Mechanism of acclimation and/or sugar action was unknown. With help of molecular and genetic approaches hexokinase mechanism as the base of glucose (Glc) negative signal effects (NSE) was opened. Synthesis of Rubisco repression served as the main indicator of NSE action. Our main aim was to find the signs of NSE of the Glc excess created experimentally in the discs of sugar beet leaves incubated in water during 41 hrs to register protein contents changes. Two plant ages inside the juvenile growth were regarded: early period (young plant, 5–6 developed leaves of 7–8 plastochrones totally) and later period (senescent plant, 10–12 developed leaves, 14–15 plastochrones totally). Portable MINI PAM fluorometer (Walz, Efeltrich, Germany) was used for Chl a fluorescence (Flu) induction kinetics measurements at 23°C. Intact leaves (L_{int}) served as the base for comparison with the leaf disks incubated in H_2O ($L_{\text{H}_2\text{O}}$). In young plants the PSII Yield in intact matured leaves (3rd) was maximal and NPQ minimal in comparison with those in both younger and older leaves. In the same plants steady state Yields of intact young leaves (L_{int}) and their discs incubated in water ($L_{\text{H}_2\text{O}}$) were close to each other. In the same plant leaves natural content of Glc was low and NSE was absent even after experimental multiple increase of its and sCH contents. Natural contents of Glc and soluble carbohydrates (sCH) in senescent plant leaves were higher, and Rubisco and sCA were correspondingly more active, than in younger plants. After incubation relative increase of Glc and sCH contents in the $L_{\text{H}_2\text{O}}$ vs L_{int} was less than it was in young plants, however, NSE distinctly appeared after incubation: the enzyme activities decreases were about 40 % initial values of both the enzymes in L_{int} . Changes of Chl a Flu characteristics totally reflected the biochemical data. We concluded that not absolute Glc or sCH content were the immediate causes of NSE Glc, but namely plant and leaf discs senescence, as result of deprivation of source-sink connections, induced switching hexokinase reaction from usual metabolic to negative signal function.

**MELAFEN AS A SYNTHETIC GROWTH REGULATOR:
EFFECT ON THE PHOTOSYNTHETIC ORGANIZMS****SHANDIEVA I.O.¹, SAVANINA Ya.V.¹, PHATTAHOV S.G.²,
LEBEDEVA A.F.¹, LOBAKOVA E.S.¹ and BARSKII E.L.¹**¹Biological Faculty of Moscow State University, 119899, Moscow²A.E.Arbutov Institute of organic and physical chemistry, Kazan' Scientific Center,
Russian Academy of Sciences, 420088, Kazan'

The effect of different melafen concentrations on the development of *Anacystis nidulans* cyanobacteria and green microalgae *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella maritima* was studied. The development *A. nidulans* culture was stimulated by the melafen concentrations 10^{-8} – 10^{-7} M added during sowing and suppressed by concentrations $>10^{-5}$ M. The effect of melafen on the cell growth in periodic cultures of *Ch. vulgaris* was more prominent. This compound in 10^{-7} M concentration enhances the growth of the culture at the exponential phase. A higher melafen concentration demonstrated lower effect on *Ch. vulgaris* cultures, and under concentrations higher than 10^{-5} M the lag-phase of growth was observed several days later. Low melafen concentrations added at starting point and during logarithmic growth phase hamper the cell division of cyanobacteria. Added during constant phase of development this substance stimulates the accumulation of biomass. The action of melafen on the *D. maritima* cultures differs from the action on *A. nidulans* and *Ch. vulgaris*. Melafen concentrations in the range 10^{-8} – 10^{-2} M accelerate the *D. maritima* growth and biomass quantity 1.5–2 times. Similar melafen effect was reported for dialysis cultures of *A. nidulans* и *Ch. vulgaris*: 10^{-7} M concentration increased 40–50 % growth and biomass accumulation. Moderate melafen concentrations do not demonstrate visible influence on pH changes and redox-potential of the medium, as equally on the carbohydrate production by cells in culture. Observed prominent differences in the melafen effect on the growth of periodic *D. maritima* cultures can be explained by its high resistance against low medium pH and high concentrations of salts, including those of heavy metals.

РЕГИСТРАЦИЯ ОБРАЗОВАНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В КЛЕТКАХ ЛИСТЬЕВ ГОРОХА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 2',7'-ДИХЛОРФЛУОРЕСЦИН-ДИАЦЕТАТА

Анна ШЕСТАК, Артем НЕСОВ, Дмитрий КИСЕЛЕВСКИЙ, Виталий САМУИЛОВ

Биологический факультет МГУ им.М.В. Ломоносова, Москва, 119992, Россия
E-mail: ann-shestak@mail.ru; FAX: 939-38-07

Комплексы реакционных центров фотосистемы I (ФСI) и фотосистемы II (ФСII) – генераторы активных форм кислорода (АФК) [1]. Для регистрации АФК в клетках листьев гороха использовали 2',7'-дихлорфлуоресциндацетат (DCFH-DA), дезацетилирующийся внутриклеточными эстеразами и окисляющийся АФК, преимущественно H_2O_2 . Объект исследования – нижний эпидермис, изолированный из листьев гороха, представляющий собой монослой из устьичных и эпидермальных клеток.

Испытаны соединения, вызывающие или ингибирующие образование АФК в клетке. Акцептор электронов менадион, восстанавливаясь фотосистемой II, b_6f -цитохромным комплексом и фотосистемой I хлоропластов, а также компонентами митохондриальной электронтранспортной цепи, окисляется O_2 с образованием супероксидного анион радикала ($O_2^{\cdot -}$) и H_2O_2 . Менадион индуцировал рост флуоресценции DCF в эпидермальной пленке листьев гороха, который усиливался при последующем добавлении H_2O_2 или подавлялся нитросиним тетразолием (НСТ), ловушкой $O_2^{\cdot -}$. Антиоксиданты N-ацетил-L-цистеин и тролокс подавляли и предотвращали менадион-индуцированное образование DCF в эпидермальных пленках из листьев гороха. Акцепторы электронов *n*-бензохинон, N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилендиамин не вызывали роста флуоресценции DCF. Эти соединения восстанавливаются ФСII, b_6f - цитохромного комплекса, ФСI хлоропластов и ЭТЦ митохондрий, но в отличие от менадиона не окисляются кислородом с образованием $O_2^{\cdot -}$. Гербициды диурон (3',4'-дихлорофенил-1,1-диметилмочевина) и бромксинил (3,5-дибром-4-гидроскибензонитрил), ингибирующие перенос электронов в ФСII, вызывали образование DCF в клетках, нечувствительное к добавке каталазы или НСТ. Диурон и бромксинил инициируют обратный перенос электронов с первичного хинона (Q_A) на реакционный центр P_{680} с образованием триплетного хлорофилла, который взаимодействует с O_2 с образованием синглетного кислорода.

1. Asada K. Plant Physiol., (2006) 141: 391–396

**PIGMENTS AND PHOTOADAPTATION IN THE NITROGEN-STARVED
MICROALGA *B3D*, *7FA5*: *>AD*, *E*; *@5*; *E3***

Alexei SOLOVCHENKO and Mark MERZLYAK

Biological Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia;
E-mail: wundy@mail.ru; Fax: +7-495-939-38-07

The adaptation of the pigment apparatus to illumination intensity under nitrogen deficiency conditions was studied in the microalga *Parietochloris incisa* comb. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), the overproducer of archidonic acid, the valuable bioactive compound [1, 2]. Under low photon flux densities (PPD), $35 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR, *P. incisa* possessed high chlorophyll (Chl) content and low carotenoid (Car)-to-Chl ratio. The cultures grown under higher PFD (200 and $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) on complete medium displayed an increase in total Car but the composition of these pigments remained unchanged [3]. In the *P. incisa* cells grown on the nitrogen-lacking (regardless of PFD) or on complete medium (only at high PFD) a considerable rise of Car/Chl was recorded due to induction of Car synthesis (on complete medium) or a decline in Chl (on nitrogen-free medium). HPLC analysis showed that, under high PFD, *P. incisa* accumulated mostly lutein (localized mainly within thylakoid membranes) and η -carotene (in cytoplasmic oil bodies [1]). The cultures grown at high PDFs on the nitrogen-free medium showed higher degree of the violaxanthin de-epoxidation accompanied by a decrease of F_v/F_m and an increase in NPQ [3]. Higher growth rate and more efficient photochemical utilization of the absorbed light energy suggest that, on nitrogen-replete medium, the adaptation of *P. incisa* to high light is more efficient than in the absence of nitrogen. In both cases, the η -carotene deposited in the oil bodies could play a significant role in the photoprotection of *P. incisa* cells by means of screening and trapping of radiation in the blue-green part of the spectrum which is otherwise absorbed by the thylakoid pigments of the alga.

1. Merzlyak M.N., Chivkunova O.B., Gorelova O.A., Reshetnikova I.V., Solovchenko A.E., Inna Khozin-Goldberg and Zvi Cohen. J. Phycol. 2007. 43. 833–843
2. Solovchenko A.E., Khozin-Goldberg I., Didi-Cohen S., Cohen Z. and Merzlyak M.N. J. Appl. Phycol. 2007. *In press*. (DOI 10.1007/s10811-007-9233-0)
3. Solovchenko A.E., Khozin-Goldberg I., Didi-Cohen S., Cohen Z. and Merzlyak M.N. Russ. J. Plant Physiol. 2008. (*In press*)

THE SLOW KINETIC OF CHLOROPHYLL FLUORESCENCE INDUCTION REFLECTS *3D34; 6ABE* FLORAL TRANSITION**Irina STRIZH and Ksenija MUSHKINA**

Plant Physiology Department, Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory d.1, k.12, 119992, Moscow, Russia
E-mail: irina.strizh@mail.ru; FAX: +7(495)9394309

Light is foremost among environmental signals that modify transition to flowering in plants. It acts through the three main variables of quality, quantity, and duration. The role of quality and duration is well described, however, the precise molecular mechanisms by which irradiance, if acting through photosynthetic assimilation, can affect flowering transition is not clear [1]. This investigation shows that the shape of chlorophyll (Chl) *a* fluorescence induction (FI) traces reflect transition to flowering in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynch. (ecotype Columbia). We have recorded the slow kinetics of Chl FI during the vegetative (leaf production) growth stage (GS), the inflorescence emergence GS and the flowering GS. During the inflorescence emergence GS the fluorescence yield increases first from an initial level (0) to a maximum (P). In a second, slow, phase, chlorophyll fluorescence decreases to a quasi steady-state (S) and then, it rises again to a second peak (M) from where it declines slowly to a terminal steady-state (T). Such typical for higher plants PSMT sequence was never observed in flowering *Arabidopsis*. We typically have not observed the PSMT phases during leaf production growth stage also. The second peak M was absent in Chl FI traces during these GS. In some cases we have recorded the M peak in vegetative plants, but in such plants the first flower bud became visible next day after Chl FI measurements. Therefore, we suggest that kinetic of Chl FI reflects not only the inflorescence emergence growth stage, but the floral transition in *Arabidopsis*. Changes in the shape of the FI curve show clearly that reproductive development caused alteration of the thylakoids photofunctioning. The slow Chl FI change is a complex phenomenon which reflects transthylakoid H⁺ gradient generation, NADP⁺/ATP balance and availability of electron sinks. According to the recent viewpoint, during the SM and the MT phases of the FI, state transitions could be increasingly dominant [2]. Analysis of phenomenology and etiology of the various phases of the Chl FI patterns may help us to clarify the photosynthesis-dependent mechanisms that control floral development in *Arabidopsis*.

[1] Thomas B. Light signals and flowering. J. Exp. Botany, 2006, V. 57, P. 3387–3393

[2] Papageorgiou G.C., Tsimilli-Michael M., Stamatakis K. The fast and slow kinetics of chlorophyll *a* fluorescence induction in plants, algae and cyanobacteria: a viewpoint. Photosynth. Res. 2007, V. 94, P. 275–290

FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF TREE PLANTS IN ONTOGENESIS

Olexandr **SYVASH**, Kateryna **DOVBYSH**, Stefan **VASYLCHENKO**, Nataliya **TOPCHYI** and Elena **ZOLOTAREVA**

M.G. Kholodny Institute of Botany, NASU, Kyiv, 01601, Ukraine
E-mail: a.syvash@mail.ru; Tel/Fax: 38-044-272-32-31

Photosynthesis is a deeply integrated process in all vital plant functions and its performance reflects a complex balance of responses on the external and internal conditions. Regulatory flexibility of the photosynthetic transformation directed upon supporting homeostasis on a whole plant level. The developmental strategy gives frames of functional activity of photosynthetic machinery, connected first of all with administration of resources to produce of seeds and provide continuity of evolution as main aim of emergence biological object.

The aim of this work was to study pigment composition and chlorophyll fluorescence in field-grown maple trees (*Acer platanoides* L.) differing in age and growth light conditions during the vegetative season.

Pigment content was determined spectrophotometrically. Chlorophyll fluorescence parameters (F_v/F_m , F'_v/F'_m , qP , qN , NPQ and λ_{PSII}) were investigated using XE-PAM fluorometer ("Walz", Germany) as described in [1, 2].

During the vegetative season the content of pigments (Chl and Car) both per mass and area unit was higher in *A. platanoides* grown in shade conditions. Car/Chls and Chl *a/b* ratios were higher in leaves of sunny maple plants. The leaves of younger trees were characterized by higher Chl and Car content in relation to elder plants. Higher total pigment content in shade-grown maple trees provides light energy capture on the level required for effective photosynthesis, growth, development and successful competition under the canopy. F_v/F_m of sun and shade trees of both ages was almost equal. However, F'_v/F'_m , qP and f_{PSII} values were higher in shade field-grown maple trees under actinic light similar to growth one. Chl fluorescence parameters of shade grown maple plants show more effective photochemistry of PSII and electron transport capacity.

1. Maxwell K., Johnson G.N. // Journal of Experimental Botany. 2000. 51. P. 659–668

2. Genty B., Briantais J.-M., Baker N.R. // Biochimica et Biophysica Acta. 1989. 990. P. 87–92

P2.27

**HYDROGEN PHOTOPRODUCTION BY *D. A6A435F7D*
53BEG>*3FGEB10* USING BY-PRODUCTS OF STARCH-CONTAINING
WASTES FERMENTATION**

TEKUCHEVA D.N., LAURINAVICHENE T.V. and TSYGANKOV A.A.

Institute of Basic Biological Problems RAS, Institutskaya st., 2, Pushchino,
Moscow region, 142290, Russia.
E-mail: tekuchevadn@rambler.ru; FAX: (4967)330532.

Purple bacteria convert light energy and organic acids to hydrogen – an alternative source of energy. It is suggested that purple bacteria are able to utilize organic acids produced during dark fermentation of organic substrates or wastes by anaerobic bacteria. So it seems to be attractive to combine dark fermentation of wastes and following utilization of organics by purple bacteria in single H₂-producing process. In this case the utilization of organic wastes should be more efficient.

The aim of this study was to reveal the effect of potential components and the real effluent the starch fermentation on growth and H₂-photoproduction by purple nonsulfur bacterium *Rba. capsulatus*.

The effects of various concentrations of organic acids, alcohols, acetone, and CO₂ were compared. Butanol appeared to be the strongest inhibitor (K_i = 50mM). Influence of the high phosphates content has been tested because phosphate buffer is used for pH maintenance in fermentation reactors. Copper and zinc ions are potential inhibitors of methanogenesis, during dark fermentation. The purple bacterias are very sensitive to Cu²⁺ and rather tolerant to Zn²⁺.

The succession of organic acids consumption out of their mixture was revealed. It was demonstrated that C₂-C₃ acids were consumed earlier. Butyrate was used when C₂-C₃ acids were utilized. Isobutyrate was consumed the latest.

In presence of the non-diluted starch wastes the growth and H₂ production were inhibited. It was connected probably with higher total salinity, phosphate and organic acids content in wastes. In support, diluted wastes (30–60 % in water) provided satisfactory growth and H₂ production. In case of dilution of wastes by Ormerod medium (50 % v/v) without ammonium and organic acids the growth was not stimulated. It proves that wastes contain all components required for normal viability of the cells.

This work was supported by program №7 for basic research of RAS and by subcontract NFA-7-77613-01 with NREL, Golden, CO, USA.

**THE EFFECT OF HEAVY METALS ON THE CONTENT OF Q_B
NON-REDUCING PHOTOSYSTEM II CENTERS IN LEAVES
AND CHLOROPLASTS OF HIGHER PLANTS**

Nataliya TOPCHIIY, Oleksandr POLISHCHUK and Elena ZOLOTAREVA

M.G.Kholodny Institute of Botany NASU, Tereshchenkiivs'ka St. 2, Kiev, 01004, Ukraine
E-mail: nataliya_topchiiy@yahoo.co.uk; Tel/Fax: +38-044-272-32-31

Photosystem II (PSII) is damaged in the presence of Me²⁺ excess both at the donor (TyrZ oxidation) and acceptor side (primary quinone acceptor Q_A, the pheophytin-Q_A-Fe region, the non-heme iron and the secondary quinone acceptor Q_B) [1]. Photoreduction of Q_B in the photosynthetic electron-transport chain is accompanied by proton uptake from external medium which is blocked by Cu²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺ ions in bacterial reaction centers. The fact that the same metals inhibited the light-dependent proton uptake in isolated chloroplasts allowed us to propose that these Me²⁺ suppress reduction and protonation of Q_B. The effect might be correlated with the increase in the content of Q_B-non-reducing PSII centers – complexes, in which the electron transfer from Q_A to Q_B is inhibited. The aim of this work was the estimation of the content of Q_B-non-reducing PSII in *Pisum sativum* leaves and chloroplasts of *Spinacea oleracea* exposed to Cu²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺ and Hg²⁺ ions. *Pisum sativum* plants were grown on hydroponic nutrient media during 2 weeks following which they were exposed to different concentrations of Cu²⁺ and Zn²⁺ (from 100 μ I up to 1,6 mM). Reaction mixture for chloroplasts contained 100 mM sorbitol, 10 mM NaCl, 10 mM tris-HCl and chloride of Me²⁺. The amount of Q_B-non-reducing PSII was measured using XE-PAM fluorometer at 40 μmol m⁻² s⁻¹ [2]. The results indicated that 1 day of exposure of the plants to Cu²⁺ and Zn²⁺ ions in the concentration in nutrient media up to 400 μ didn't cause any changes in the content of Q_B-non-reducing PSII. 0,8 mM and 1,6 mM of Cu²⁺ and Zn²⁺ led to increase in the content of Q_B-non-reducing PSII in leaves. More pronounced influence of studied metals (Cu²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺ and Hg²⁺) on the content of Q_B-non-reducing centres in chloroplasts during 1 minute of exposure was revealed for Zn²⁺ ions at concentration of 50, 100 and 150 μM. Thus, these results allow us to conclude that investigated metals inhibit electron transport between Q_A and Q_B sites.

1. Jegerschöld C., Arellano J.B., Schröder W.P, van Kan P.J.M., Barón M., Styring S. // Biochemistry. 1995. 34. P. 12747–12754.

2. Tomek P., Ilik P., Lazar D., Stroch M., Naus J // Plant Science. 2003. 164. P. 665–670.

**CHANGE OF THE PHOTOSYNTHETIC PIGMENT CONTENT
IN THE BIRCH LEAF LAMINA FOR ADAPTATION
TO ANTHROPOGENIC LOAD**

Elena YEROFEEVA, Maria NAUMOVA and Alexandra SELEZENEVA

University of Nizhni Novgorod, Russia, 603950, Nizhni Novgorod, pr. Gagarina, 23,
NNSU, dep. of Ecology
E-mail: progresso.1812_g@list.ru; Ph. / Fax: (8)-906-35-91-293 / (8)-831-465-62-43

Various polluting substances not always cause decrease of photosynthetic pigment content in plants. It is shown, that they (in low concentration) can stimulate synthesis of pigments. On the basis of it, the goal of work was studying photosynthetic pigment content in a leaf lamina of the birch (*Betula pendula* Roth.) growing near to highways of Nizhni Novgorod, at change of motor car load quantity in a wide range of values.

Birch leaf lamina collected in second half of July in ten Nizhniy Novgorod biotopes, located directly along highways with various quantity of a motor transport stream (from 59 to 3964 motor car/hour). Control biotope has been located outside Nizhni Novgorod. In the incorporated sample of leaf laminae from each tree defined the content of chlorophylls A, B and carotenoid pigments.

Results regression analysis have shown, that dependence of content of chlorophylls A ($R^2=0.76$; $p=0.02$), B ($R^2=0.62$; $p=0.03$) and carotenoid pigments ($R^2=0.92$; $p=0.01$) in birch leaf lamina from a motor transport stream is described by the second power polynomial equations and has biphasic nature. The increase of a motor transport stream (from 59 to 2204 car/hour) in the first phase of dependence caused decrease of the all pigment content in a birch by comparison with a control biotope level. In the second phase of dependence by increase of motor car load (from 2204 to 3964 car/hour) the pigment content in a birch gradually increased and mounted to a control biotope level ($p>0.05$). Probably, that development of the second phase of dependence is caused by transition of a plant organism in other adaptive state, in which stability to emissions of polluting substances above by comparison with the previous state (the first phase of dependence).

**THE ROLE OF BOUND BICARBONATE IN PHOTOSYNTHETIC
PROTON TRANSLOCATION****Elena ZOLOTAREVA, Vladimir PODORVANOV
and Olexander POLISHCHUK**

M.G.Kholodny Institute of Botany Natl.Acad.Sci. Ukraine, Tereshchenkivs'ka St. 2, Kiev, 01004, Ukraine; E-mail:membrana@ukr.net; Tel/Fax: +380-44-272-32-31

Besides of the high-affinity bicarbonate molecules, which controls PSII activity, there is a pool of bound bicarbonate (about 1mol/mol Chl) with unknown functional role. Due to its ability to bind protons with pKa ~6,34 the membrane-bound bicarbonate pool might contribute into buffer capacity (η) of thylakoids. η is one of the most important parameters of a chemiosmotic system during dark – light transients. It is assumed that η is provided by the charge groups of membrane proteins. The object of the work was to estimate the possible contribution of the bound bicarbonate pool in the buffer capacity of thylakoids and its role in photosynthetic proton translocation.

Chloroplasts isolated from spinach leaves and washed from exogenous buffers by isotonic unbuffered medium were titrated by dilute HCl or NaOH solutions. The results were recorded and treated by the packages of UT60E Interface Program and Microsoft Excel 2000 software. Amount of membrane bound bicarbonate was determined by IRGA as the amount of CO₂, evolved at destruction of membranes by 10 N HCl.

Bicarbonate from chloroplasts was depleted by prolonged (up to 3 h) N₂ bubbling at ice bath temperature without inactivation of photosynthetic electron transport. As a result the amount of buffer groups, titrated in the pH range 4–9, reduced on 10 % – on 0.35 μ mol/mg Chl. If carbonic anhydrase (CA) inhibitors - acetazolamide (AZ) or ethoxazolamide (EZ) – were added to thylakoid suspension in the process of N₂ bubbling, the amount of the groups, which titrated in the pH range 4–9, reduced on about 30 % – on 1.1 μ mol/mg Chl. The results suggest that CA controls the amount of membrane bound bicarbonate and the buffer capacity value of thylakoids. IRGA shown that the total content of bound bicarbonate in thylakoids diminished during incubation with AZ in a greater degree, what with EZ. It was shown that the value of light-induced proton uptake (H⁺) in thylakoid suspension in contrast to pH value correlates with the amount of bound bicarbonate and CA activity The results suggest that bound bicarbonate is a main thylakoid membrane buffer at pH 4–9 and participates in photosynthetic proton translocation.

P2.31

**SYNERGISM IN ACTION OF AMMONIUM AND PALMITIC ACID
IN UNCOUPLING OF CHLOROPLAST THYLAKOIDS**

Lilia VASJUKHINA and Vera OPANASENKO

Institute of Basic Biological Problems, RAS, Pushchino, Moscow Region,
142290, Russia
E-mail: lilia.vasyuhina@rambler.ru

The ammonium uncoupling of electron transfer, ATP synthesis and light induced proton uptake was studied at the level of electron transfer on different parts electron transport chain (ETC). It was shown that addition of 20–40 μ M palmitic acid (PA) increased the ammonium inhibition of ATP synthesis and light induced proton uptake in several times. The inhibition is a result a reduction of proton gradient and it is accompanied by acceleration of electron transfer in the whole chain.

If the chloroplasts were washed and kept on the medium contained the fatty acid free albumin that the effectiveness of ammonium uncoupling was low.

As it was supposed the synergism of the action of the palmitic acid and ammonium follows not from their ability to form lipophilic ion pairs. The lipophilic ion pairs are arose usually from hydrophobic weak acids and bases which are presented in the medium simultaneously. In the chloroplast we found synergism between carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) and tetracaine or dibucaine and both of these pairs induced uncoupling actions. Ion pairs between PA and lipophilic amine, between ammonium and CCCP were found ineffective in uncoupling.

It is suggested that synergism of action of these endogenous substances (PA and ammonium) provides the special function to regulate softly the system of energy coupling in the native chloroplasts.

ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ БЕЛКОВ ФОТОСИНТЕЗА В ЦИАНОБАКТЕРИАЛЬНЫХ МУТАНТАХ ПО КЛЕТОЧНОМУ ДЕЛЕНИЮ

Ольга КОКШАРОВА

Институт Физико-Химической Биологии им. Белозерского А.Н., МГУ им. Ломоносова, Москва, 119992, Россия;
E-mail: OA-Koksharova@rambler.ru; FAX: +7-495-939-31-62

Целью исследования было установление спектра изменений, связанных с блокированием клеточного деления и плейотропным влиянием мутаций *ftn2* и *ftn6* на протеомную картину клеток цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942.

Впервые проведен сравнительный протеомный анализ клеток мутантов *Ftn2* и *Ftn6* *Synechococcus* sp. PCC 7942, дефектных по клеточному делению. Мутации в *ftn2* и *ftn6* генах обладают плейотропным эффектом, изменяя экспрессию не менее 44 белков, принадлежащих к разным функциональным категориям. Уровни пяти различных фотосинтетических белков изменены в одном или обоих мутантах. Количество белка PsaD сильно снижено в клетках обоих мутантов. PsaD является маленьким, внешним полипептидом, локализованным на стромальной стороне (цитоплазматической стороне в цианобактериях) реакционного центра (РЦ) комплекса фотосистемы I, и требуется для сборки реакционных кластеров ФС I и вовлечен в электростатическое связывание ферредоксина внутри РЦ. Среди других белков, уровень которых существенно снижен в клетках мутантов, обнаружены альфа цепь аллофикоцианина, фикобилисомный линкерный полипептид и гипотетический белок, имеющий гомологию с белком фикобилисом. Таким образом, *ftn2* и *ftn6* мутации имеют негативный эффект на светособирающие пигменты и могут затронуть эффективность фотосинтеза в мутантах. Сниженное количество трех белков, имеющих отношение к фикобилисомам, вероятно, может быть результатом их быстрой деградации и возможного использования клеткой в качестве внутреннего источника азота в стрессовых условиях. В противоположность перечисленным выше белкам фикобилисом и PsaD белку, уровень предшественника белка, стабилизирующего Mn, возрастает в два или в четыре раза в мутантных клетках. Марганец-стабилизирующий белок связан с кислород-выделяющей системой фотосистемы II и может обеспечивать лигандами марганцевый комплекс. Цианобактериальные мутанты *Ftn2* и *Ftn6* могут представлять интерес для изучения первичных процессов, биохимии и регуляции фотосинтеза.

P2.33

**INTERACTION OF PYROPHOSPHATE WITH NONCATALYTIC
NUCLEOTIDE BINDING SITES OF CHLOROPLAST ATP SYNTHASE**

Alexander PRONIN and Alexander MALYAN

Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, Pushchino,
Moscow Region, 142290, Russia
E-mail: pron_as@mail.ru; FAX: (4967)33-05-32

ATP synthases of chloroplasts, mitochondria and bacteria catalyze ATP formation at the expense of transmembrane electrochemical proton gradient. The enzyme comprise of membrane embedded CF_0 and peripheral CF_1 parts. CF_1 part of ATP synthase contains three catalytic and three noncatalytic sites. Under conditions of low transmembrane electrochemical proton gradient, ATP synthase catalyses ATP hydrolysis. The product of hydrolysis, ADP, tightly binds to one of catalytic site, the binding results in so called reversible MgADP-dependent inactivation of ATP synthase. The inactivation is reversed by ATP binding to a noncatalytic site of ATP synthase. Besides ATP some oxyanions also restore ATPase activity of inactive ATP synthase. One of them is pyrophosphate. In the present research pyrophosphate interaction with noncatalytic sites of DTT-modulated chloroplast ATP synthase was studied. Obtained results indicate that pyrophosphate tightly binds to noncatalytic sites of ATP synthase, prevents binding of adenine nucleotides to these sites and impedes ATPase activity decay induced by tight MgADP binding to one of the catalytic sites.

Секция 3:

Фоторецепция

Тезисы докладов

ДЗ.1

**ФЕМТОСЕКУНДНАЯ ДИНАМИКА ПЕРВИЧНОЙ
ФОТОРЕАКЦИИ РОДОПСИНА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДЛИНЫ
ВОЛНЫ ВОЗБУЖДЕНИЯ В ДИАПАЗОНЕ 500–560 НМ**

**СМИТИЕНКО О.А., ШЕЛАЕВ И.В.¹, ГОСТЕВ Ф.Е.¹,
ФЕЛЬДМАН Т.Б., НАДТОЧЕНКО В.А.^{1,2}, САРКИСОВ О.М.¹,
ОСТРОВСКИЙ М.А.**

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,

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

²Институт проблем химической физики РАН,

117334, Москва, ул. Косыгина, 4, т. 8(495)939-7154, E-mail: djolia@mail.ru

Динамика первичной фотореакции зрительного пигмента родопсина, представляющей собой *цис-транс* изомеризацию хромофорной группы 11-*цис*-ретинала, изучалась в фемто- и пикосекундном временных диапазонах при возбуждении фемтосекундными импульсами света с несущими длинами волн 500, 535 и 560 нм. Эту реакцию можно представить как движение когерентного колебательного (волнового) пакета, созданного фемтосекундным импульсом, по электронно-возбужденной (S_1) поверхности потенциальной энергии (ППЭ) вдоль координаты реакции. В области конического пересечения S_1/S_0 поверхностей большая часть энергии переходит на S_0 ППЭ, в результате чего через 200 фс после возбуждения образуется первый продукт реакции – фотородопсин с колебательно-возбужденным полностью *транс*-ретиналом. Оставшийся волновой пакет продолжает движение по S_1 ППЭ и на обратном пути перескакивает на S_0 ППЭ, образуя другой продукт – молекулы родопсина с колебательно-возбужденным 11-*цис*-ретиналом. Когерентные колебательные пакеты были зарегистрированы в обоих продуктах. Проведенный Фурье анализ динамики когерентных волновых пакетов показал, что в двух колебательно-возбужденных продуктах реакции заселяются близкие по значениям низкочастотные колебательные моды, амплитуды и фазы которых различны. Различие фаз колебательных мод свидетельствует о непосредственном участии этих мод в первичной фотореакции родопсина. Длина волны возбуждения молекулы родопсина в диапазоне 500–560 нм влияет на соотношение амплитуд различных фурье-компонент, что отражает различное заселение реакционных колебательных мод в процессе возбуждения и соответственно в ходе реакции. В работе показано, что когерентную реакцию можно характеризовать как резкое изменение фазы реакционных колебательных мод. Также показано, что изучение реакции в когерентном режиме позволяет получать больше информации, чем в стохастическом режиме.

ОСОБЕННОСТИ ФОТОПРЕВРАЩЕНИЯ РОДОПСИНА НА РАННИХ СТАДИЯХ ФОТОЛИЗА

Татьяна **ФЕЛЬДМАН**

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 119334, Россия
E-mail: feldman@sky.chph.ras.ru; Fax: +7-495-137-41-01

С тех пор, как был описан в 60-х годах Дж. Уолдом и Т. Йошизавой процесс образования батородопсина и его перехода в следующий продукт в ходе фотолиза родопсина [1], до сих пор остается неясным, является ли этот процесс однолинейным, или существуют параллельные пути фотопревращения зрительного пигмента. Ими, а также и другими исследователями, было обнаружено, что кинетики образования промежуточных продуктов носят двух- и трех-компонентный характер, а на дифференциальных спектрах, отражающих переход одного интермедиата в другой, отсутствует изобестическая точка [2]. Из этого следует, что, возможно, идет образование более, чем одного продукта на ранних стадиях фотолиза родопсина. Действительно, согласно нашим данным, фракция батородопсина не является однородной. Это было показано при исследовании конформационного состояния ретиналя в продуктах фотопревращения родопсина, полученных при температуре жидкого азота (-196°C) тремя различными методами (спектрофотометрический, ВЭЖХ свободных ретиналей и ВЭЖХ ретинальоксимов) [3]. При исследовании дифференциальных спектров поглощения, отражающих процесс перехода батородопсина в люмиродопсин, было показано, что при низких температурах (около -155°C) идет образование продукта, который появляется, практически, одновременно с образованием люмиродопсина, но спектрально отличный от него [4]. Было предположено, что этот продукт представляет собой одну из спектральных форм люмиродопсина и что процесс фотолиза идет, как минимум, по двум путям релаксации фотовозбужденного состояния родопсина. Были предприняты попытки обнаружить появление более чем одного продукта фотолиза родопсина при комнатной температуре на стадиях образования фото- и бато-родопсина с помощью фемтосекундной лазерной спектроскопии. На дифференциальных спектрах, отражающих переход фотородопсина в батопродукт, было отмечено наличие длинноволнового плеча. Для понимания природы происхождения побочных продуктов при фотолизе родопсина была проанализирована структура 11-*цис*-ретиналя в темноадаптированном, необлученном родопсине с помощью метода молекулярного моделирования [5]. На основе сопоставления экспериментальных данных с теоретическими расчетами обсуждаются возможные пути фотопревращения зрительного пигмента родопсина при поглощении им кванта света.

1. Yoshizawa T., Wald G. Nature. 1963. V. 197, P. 1279–1285.

2. Hug S.J., Lewis J.W., Kliger D.S. J. Am. Chem. Soc. 1988. V. 110, P. 1998–1999.

3. Т.Б. Протасова, В.Ф. Тарасов, И.Б. Федорович. Сенсорные системы. 1989. Т. 3. № 1. С. 19–24.

4. Фельдман Т.Б., Федорович И.Б., Островский М.А. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2003. Т. 89. № 2. С. 113–122.

5. Kh.T. Kholmurodov, T.B. Feldman and M.A. Ostrovsky. Mendelevov comm. 2006. N1. 1–8.

**THE STRUCTURE OF A COMPLETE PHYTOCHROME SENSORY
MODULE IN THE PR GROUND STATE****Jon HUGHES¹, Jo MAILLIET¹, George PSAKIS¹ and Lars-Oliver ESSEN²**¹Plant Physiology, Justus Liebig University Giessen, 35390 Giessen, Germany;

E-mail: jon.hughes@uni-giessen.de; FAX: +496419935429

²Structural biochemistry, Philipps University Marburg, 35032 Marburg, Germany

Phytochromes are red/far-red photochromic biliprotein photoreceptors which in plants regulate seed germination and mediate many other light effects. The structure/functional basis of the phytochrome photoswitch is scarcely known, however.

We report the structure of the complete sensory module of the cyanobacterial phytochrome Cph1. Although the PCB chromophore is attached to Cys-259 as expected, the *ZZZssa* conformation – also reported for bacteriophytochrome bidomains – does not correspond to that predicted from Raman spectroscopy. We show that the PHY domain, previously considered unique to phytochromes, is structurally a member of the GAF family. Indeed the tandem-GAF dumbbell revealed for phytochrome sensory modules is remarkably similar to the regulatory domains of cyclic nucleotide phosphodiesterases and adenylyl cyclases. A unique feature of the PHY domain structure is a long, tongue-like protrusion which seals the chromophore pocket and is necessary to stabilize the photoactivated P_{fr} state. The tongue carries a conserved PRxSF motif from which an arginine finger points into the chromophore pocket close to ring D forming a salt bridge with a conserved aspartate residue. The structure we present provides a framework for light-driven signal transmission in phytochromes.

Д3.4

ЦИКЛИЧЕСКИЙ ГУАНОЗИН-3',5'-МОНОФОСФАТ – КЛЮЧЕВОЙ ЭЛЕМЕНТ СВЕТОВОГО И ФИТОГОРМОНАЛЬНОГО СИГНАЛЬНОГО КРОССТОКА В РАСТЕНИЯХ

Людмила ДУБОВСКАЯ, Игорь ВОЛОТОВСКИЙ

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Академическая 27,
220072 Минск, Беларусь
E-mail: dubovsk@mail.ru; FAX: +375-172-84-23-59

Известно, что циклический гуанозин-3',5'-монофосфат (цГМФ) способен выполнять роль посредника при передаче сигнала от рецептора к целевому элементу в промоторе гена. Однако его особое место и механизм действия в процессах сигнальной трансдукции в растениях пока окончательно не ясны.

Показано, что в клетках проростков овса присутствует функционально активная система метаболизма цГМФ. Установлена ее функциональная связь с фотоморфогенетическими рецепторами высших растений. Активность ферментов обмена цГМФ в проростках овса и концентрация цГМФ модулируются красным и синим светом, адресованным фоторецепторам фитохрому и криптохрому соответственно. Установлено, что указанные ферменты участвуют в процессах фитогормональной регуляции. Показано участие G-белков и системы Ca^{2+} /кальмодулин в регуляции метаболизма цГМФ. цГМФ и ферменты его обмена являются ключевыми элементами молекулярного кросстока между сигнальными каскадами в растениях.

Совершенно новыми являются данные о цГМФ-связывающей активности в растительных субклеточных фракциях. В клетках проростков овса обнаружены центры специфического связывания цГМФ белковой природы, сродство которых к цикломононуклеотиду контролируется Ca^{2+} , кальмодулином, ГТФ и светом, по всей видимости, с участием фитохрома.

Таким образом, цГМФ и ферменты его обмена являются важными элементами молекулярного кросстока между световыми и фитогормональными сигнальными каскадами в растениях.

СИГНАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ЦИАНОБАКТЕРИЙ**Дмитрий ЛОСЬ**

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
Ботаническая ул., 35, Москва, 127276, Россия
E-mail: losda@ippras.ru; FAX: +7-495-977-93-72

Фоторецепция, так же как и реакция клеток на стрессовые воздействия, начинается с восприятия сигнала сенсорным белком с последующей передачей сигнала к регуляторным областям генов стрессового ответа. Использование ДНК-микрочипов в комбинации с систематическими мутациями потенциальных регуляторных генов сделало возможным идентификацию сенсоров и передатчиков стрессовых сигналов у цианобактерий, а также ранее неизвестных генов стрессового ответа. В докладе суммируются последние данные о сигнальных системах цианобактерий, включая двухкомпонентные системы регуляции, серин-треониновые протеинкиназы эукариотического типа и некоторые другие способы регуляции геной экспрессии.

ФОТОХИМИЯ КОФЕРМЕНТОВ И ПРОБЛЕМА ЭВОЛЮЦИОННОГО ОТБОРА ФОТОСЕНСОРНЫХ ХРОМОФОРОВ В БЕЛКАХ**М. С. КРИЦКИЙ**

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071, Россия
E-mail: mkritsky@inbi.ras.ru; факс (+7-495) 9542732

Согласно данным эволюционной биохимии, а также модельных экспериментов, птеридины и бензоптеридины (изоаллоксазины) вошли в метаболизм клетки в ранней эволюции. Установлена возможность их абиогенеза, в том числе, как компонентов аминокислотных и нуклеотидных полимеров. Эти пигменты сенсибилизируют консервацию энергии света в виде восстановленных продуктов, а также в макроэргических связях АТФ, но их эффективность не конкурентоспособна по сравнению с хлорофилльным фотосинтезом.

В организмах коферменты «темнового» биокатализа – 5,10-метенилтетрагидрофолат (МТГФ), флавиномононуклеотида (ФМН), флавинадениндинуклеотида (ФАД), 7,8-диметил-5-дезазарибофлаavin (ДРФ) функционируют как фотосенсоры в нескольких семействах рецепторов света, не связанных с запасанием солнечной энергии. Анализ структуры апобелков этих семейств (ДНК-фотолиазы и криптохромы, PAS(LOV)-домен содержащие белки, BLUF-домен содержащие белки, нитратредуктазы эукариот) указывает на их конвергентное происхождение.

Возникает вопрос, какие свойства коферментов были важны для их отбора на роль фотосенсоров? Сопоставление значений ζ_{\max} и κ_{\max} флавинов, птеринов и структурно близких метаболитов указывает на то, что круг коферментов-фотосенсоров, скорее всего, ограничен уже известными ФМН, ФАД, ДРФ и МТГФ. Анализ структуры и свойств МТГФ (кофермента «темнового» метаболизма С1 группы) подводит к пониманию закономерностей его отбора на роль хромофора в белке. Значение имело наличие в протонированной молекуле МТГФ восстановленного (тетрагидро-) птеридина, а также конъюгированного с ним имидазолинового цикла. Сочетание в такой структуре высокой фотон-поглощающей способности в физиологической области спектра с фотохимической устойчивостью могло иметь селективные преимущества при отборе МТГФ на роль светосборщика в ДНК-фотолиазах и криптохромах.

Поддержано грантами РФФИ 07-04-42600-а и 06-04-90599-БНТС-а.

ДЗ.7

ФОТОХИМИЯ ФЛАВИНОВ В РЕЦЕПТОРАХ ГОЛУБОГО СВЕТА

Татьяна ДОМРАЧЕВА¹, Пете SCHLICHTING¹, Белла ГРИГОРЕНКО²,
Александр НЕМУХИН^{2,3}

¹Max Planck Institute for Medical Research, Department of Biomolecular Mechanisms, Jahnstr. 29, 69120 Heidelberg, Germany

E-mail: tatjana.domratcheva@mpimf-heidelberg.mpg.de; Тел: +496221486504

²Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,

Ленинские горы, 1/3, Москва, 119992, Россия

³Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, улица Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

Недавно открытые фоторецепторные белки, содержащие домен BLUF (сенсор голубого света с использованием хромофора FAD), ответственны за реакцию на голубой свет в бактериях. При фотоактивации белки с доменом BLUF переходят в сигнальное состояние, для которого характерно образование фотоинтермедиата со сдвинутой на 10 нм в красную сторону полосой поглощения хромофора. AppA из *Rhodobacter sphaeroides* является одним из белков данного семейства с достаточно долгоживущим (до 30 минут) интермедиатом. Обе недавно опубликованные кристаллические структуры AppA [1,2] были отнесены авторами к темному состоянию белка, несмотря на очевидные различия в трехмерной структуре. Мы применили современные методы молекулярного моделирования, включая квантовую химию и комбинированные методы квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ) для расчетов структуры, оптических и колебательных спектров домена BLUF белка AppA [3]. Подразделение системы на КМ- и ММ-части производилось на основании трехмерных атомарных моделей белков, и к КМ-подсистеме были отнесены хромофорная группа и ближайшие к ней аминокислотные остатки. По результатам моделирования одна из кристаллических структур [1] была отнесена к интермедиату. Предложена схема образования фотопродукта, согласно которой при поглощении света происходит таутомеризация боковой цепи Gln63, непосредственно взаимодействующей с хромофорной группой.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 07-03-00059 и грантом Deutsche Forschungsgemeinschaft (FOR 526).

1. S. Anderson, V. Dragnea, S. Masuda, J. Ybe, K. Moffat, C. Bauer, *Biochemistry*, 2005, 44, 7998-8005.

2. A. Jung, T. Domratcheva, M. Tarutina, Q. Wu, W. H. Ko, R. L. Shoeman, M. Gomelsky, K. H. Gardner, I. Schlichting, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102, 12350-12355.

3. T. Domratcheva, B. Grigorenko, I. Schlichting, A. Nemukhin, *Biophys. J. BioFAST: February 8, 2008*, doi:10.1529/biophysj.107.124172

ФОТОЗАЩИТА У ЦИАНОБАКТЕРИЙ: КСАНТОФИЛЛ-БЕЛКОВЫЙ КОМПЛЕКС КАК ФОТОРЕЦЕПТОР И МЕДИАТОР ДИССИПАЦИИ ИЗБЫТОЧНОЙ СВЕТОВОЙ ЭНЕРГИИ

РАХИМБЕРДИЕВА М.Г.¹, ЕЛАНСКАЯ И.В.², КАРАПЕТЯН Н.В.¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071 Москва, Ленинский проспект 33, тел. 954-30-17, факс 954-27-32, E-mail: rakhimberd@inbi.ras.ru

²Биологический факультет МГУ

Обнаружен новый путь диссипации избыточной энергии фотосинтетическим аппаратом цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 и выявлен принципиальный механизм этого явления. Совпадение спектра действия нефотохимического тушения флуоресценции со спектром поглощения ксантофилла [1] позволило выявить фоторецепторную функцию каротиноидов, являющихся хромофорами особого класса водорастворимых белков.

Исследование кинетики тушения и спектров испускания флуоресценции мутантных штаммов *Synechocystis* sp. показало, что ни стрессовый комплекс IsiA, ни комплексы фотосистем не являются обязательными в данном типе тушения флуоресценции. Отсутствие тушения у мутантов по аллофикоцианину указывает на необходимость аллофикоцианинового ядра фикобилисом в фотоиндуцированном тушении. Предполагается, что тушителем флуоресценции аллофикоцианина, является сам каротин-белковый комплекс. Установлена возможность опосредованного аллофикоцианином тушения флуоресценции хлорофилла фотосистемы II в условиях закрытого реакционного центра [2].

Энтальпия активации светового процесса составляет более 80 кДж/моль при 5°C и монотонно снижается при повышении температуры [3]. Подобная неаррениусова температурная зависимость константы скорости типична для процессов сборки водорастворимых белков, где изменение теплоемкости соответствует экспозиции гидрофобной поверхности при конформационном переходе.

1. Rakhimberdieva M.G., Stadnichuk I.N., Elanskaya I.V., Karapetyan N.V. (2004) *FEBS Lett.* 574:85–88

2. Rakhimberdieva M.G., Vavilin D.V., Vermaas W.F.J., Elanskaya I.V., Karapetyan N.V. (2007) *Biochim. Biophys. Acta* (Bioenergetics) 1767, 757–765

3. Rakhimberdieva M.G., Bolychevtseva Y.V., Elanskaya I.V., Karapetyan N.V. (2007) *FEBS Lett.* 581, 2429–2433

**МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И СПЕКТРОВ
БАТОРОДОПСИНА – ПЕРВИЧНОГО ИНТЕРМЕДИАТА
В ЦИКЛЕ ЗРИТЕЛЬНОЙ РЕЦЕПЦИИ**

**Мария ХРЕНОВА¹, Анастасия БОЧЕНКОВА¹, Александр ГРАНОВСКИЙ¹,
Сергей КОНЮХОВ¹, Белла ГРИГОРЕНКО¹,
Александр НЕМУХИН^{1,2}**

¹Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/3, Москва, 119992, Россия
E-mail: wasabiko@rambler.ru; Тел: +7-495-939-48-40

²Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, улица Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

Мы применяем комбинированный метод квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ) для моделирования строения, оптических и колебательных спектров интермедиатов белка зрительной рецепции родопсина. Согласно данному подходу расчет энергий в квантовой подсистеме проводится по компьютерным программам квантовой химии, а в молекулярно-механической подсистеме – с использованием силовых полей. Подразделение системы на КМ- и ММ-части производится на основании анализа доступных трехмерных атомарных моделей белков, содержащихся в базе данных белковых структур (PDB). Для практических расчетов к КМ-подсистеме относится хромофорная группа молекулы ретиналя в виде протонированного основания Шиффа и ближайшие к ней аминокислотные остатки. Равновесные геометрические конфигурации и частоты гармонических колебаний рассчитаны методом КМ/ММ с использованием приближения PBE0/aug-cc-pVDZ теории функционала плотности в квантовой подсистеме и силового поля AMBER для молекулярно-механической подсистемы. Расчеты вертикальных энергий возбуждений S0-S1 выполнены в рамках многоконфигурационных методов самосогласованного поля (CASSCF) с учетом поправок по теории возмущений (aug-MCQDPT2). Ранее подобная методология была успешно применена для описания структуры и спектров “темной” формы родопсина [1].

В данном сообщении подробно обсуждаются результаты моделирования строения и спектров одного из первых интермедиатов цикла зрительной рецепции – батородопсина. Вычисленное для модельной системы положение максимума полосы поглощения S0-S1 (519 нм) хорошо согласуется с экспериментальными результатами (529-543 нм). Сопоставлены геометрические конфигурации и колебательные моды в областях связывания хромофорной группы для родопсина и батородопсина.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 08-03-00914.

K. Bravaya, A. Bochenkova, A. Granovsky, A. Nemukhin, *J. Amer. Chem. Soc.*, 2007, 129, 13035.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕТИНАЛЬНОЙ ОСТРОТЫ ЗРЕНИЯ ЧЕЛОВЕКА И НИЗКО-КОГЕРЕНТНАЯ ОПТИЧЕСКАЯ ТОМОГРАФИЯ ФОВЕАЛЬНОЙ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ФОТОРЕЦЕПТОРНЫХ КЛЕТОК

Гариф АКЧУРИН¹, Владимир МАКСИМОВ², Оксана НАУМОВА²

¹Саратовский госуниверситет, Саратов, 410012, Россия
E-mail: AkchurinGG@mail.ru; FAX: +7-845-22-785-29

²Областная офтальмологическая больница, Саратов, 410051, Россия

В офтальмологии известно, что максимальная острота зрения у человека, измеренная с помощью таблиц оптотипов (кольца Ландольта или Головина-Сивцева) равная 1 соответствует одной угловой минуте [1] и обусловлена морфологическим строением центральной (фовеальной) области сетчатки, поперечным размером колбочек и эволюционно ограничивалась дифракцией света в оптической системе глаза. Использование лазерного ретинометра позволяет определить остроту зрения (V) в диапазоне 2- 0.01 для “красных” и “зеленых” колбочек независимо от оптических свойств глаза, даже при наличии катаракты [2]. Предложен и апробирован метод пространственного измерения ретиальной остроты зрения в пределах десятков градусов.

Неинвазивная “оптическая гистология” макулярной области сетчатки *in vivo* осуществлялась с помощью низко-когерентного оптического томографа (ОСТ) фирмы “Carl Zeiss”. Пространственное разрешение по глубине составляло 8 микрон и определялось длиной когерентности $\pm L$ излучателя. Томограф позволял измерять отраженную назад от различных слоев сетчатки интенсивность излучения из объема когерентности, определяемого произведением $\pm L$ на диаметр светового пучка. Проведенные измерения позволили измерить размер фовеальной ямки и оценить число колбочек, однозначно связанных через биполярные с ганглиозными клетками и ответственных за максимальную остроту зрения. Как показали измерения, типичное число монохромных колбочек в фовеа составляет 10^4 , поэтому при ретиальной $V = 0.1$, если патология обусловлена инактивацией колбочек, то нормально функционирующих фоторецепторных клеток в фовеа осталось не более 100 клеток. Действительно при макулярной дистрофии сетчатки, наблюдаемой у пациентов на ОСТ, острота зрения составляет менее 0.05.

1. Шамшинова А.М., Волков В.В. Функциональные методы исследования в офтальмологии. М.: Медицина, 1999.

2. Акчурин Г.Г. Оптический журнал, 2006, т.73, №12, с. 30–36.

PHOTOREGULATION OF THE EXPRESSION OF PHOSPHOLIPASE D GENE IN OAT SEEDLINGS

**Iryna A. KRYVULIA, Elena M. KABACHEVSKAYA,
Georgy V. LIAKHNOVICH, Igor D. VOLOTOVSKI**

Institute of Biophysics and Cell Engineering of NAS of Belarus, Academicheskaya str.,27,
Minsk, BY-220072, Belarus
E-mail: lmbc@biobel.bas-net.by

Phospholipase D (PLD) is a multifunctional plant enzyme, playing a key role in a broad range of cellular processes. It is known that light with involvement of phytochrome photoreceptor and association with photosynthesis process regulates PLD enzyme activity in oat seedlings.

It was supposed that the synthesis of an enzyme *de novo* (e.g., at the mRNA level) is involved in observed light-dependent PLD activity modulation, because the effect of light/dark on PLD activity characterized by extended lag period. In this study we used real-time RT-PCR to estimate relative expression (R) of *PLD* gene in oat seedlings under different conditions of light growth.

It was found that steady-state *PLD* mRNA level in green oat seedlings were differed from that in etiolated (Et) seedlings (in green seedlings it is more than 2 fold lower). In addition, R of *PLD* gene was decreased in Et seedlings after 1 hour illumination by red light (RL, $\zeta = 660$ nm, $R_{Et}:R_{Et+RL} = 1 : 0,51$). While RL stimulated a decrease in *PLD* gene expression in Et oat seedlings, far-red light (FRL) reversed effect of RL. When Et plants were sequentially illuminated by RL and FRL, *PLD* R was close to R in control etiolated plants.

It was also shown that the incubation of green oat seedlings in the dark for 3 days resulted in appreciable R increase as compared with control samples. Moreover, it turned out that *PLD* gene expression in green plants depended on age of oat seedling. In younger seedlings PLD gene expression was lower than that in older ones.

Obtained results assume that expression of oat PLD gene is light dependent. The effective influence of RL/FRL indicates that light signal perception transforms using photoreceptor phytochrome. The increase in gene expression and subsequent increase in PLD enzyme activity is presumably an adaptive reaction to the conditions unfavorable for photosynthesis. This suggestion is confirmed by *PLD* gene expression increase in response to long-term darkening.

This study was supported by Belarus State Foundation for Fundamental Research, grant № B07K-058.

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ФИТОХРОМА В РЕГУЛЯЦИИ УРОВНЯ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА И АНТИОКСИДАНТНОГО ПОТЕНЦИАЛА ЛИСТЬЕВ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

ЛЮБИМОВ В.Ю., КРЕСЛАВСКИЙ В.Д.

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пушкино,
Московская область, 142290, Россия
E-mail: valyu@online.stack.net; Тел.: +7-(4967) 7329-88

В растительных организмах всех таксономических уровней, наравне с другими, существуют две регуляторные системы: фитохромная и окислительная (H_2O_2 и O_2^-). Сигналы, запускаемые этими механизмами, модулируют работу генома и, через МАПККК, активность ряда ферментов. Однако существует значительное эколого-физиологическое различие между этими системами: первая работает под управлением постоянно действующего, меняющегося со временем (в течение суток, сезонно), сигнала (КС/ДКС), а вторая запускается множеством «случайных» стрессоров (свет, температура, УФ, инфекция и т.д.). Эти сигнальные тракты – каждый в отдельности – интенсивно изучаются, а возможное взаимодействие между ними остаётся пока менее исследованным.

В нашей работе постоянное освещение вегетирующего растения китайской капусты дополнительно к ФАР низкоэнергетическим КС (3 Вт м^{-2} , 660 нм) приводило к снижению стационарного пула H_2O_2 на 40 %. Динамику процесса изучали на листьях этиолированной пшеницы. Показано, что за первые 15–30 минут после кратковременного (7 минут) КС-облучения проростков, происходило резкое – на 60–80% – снижение пула H_2O_2 . Этот уровень перекиси сохранялся в листьях пшеницы в течение 1–1,5 часов, после чего начинал линейно нарастать и достигал контрольной величины через 4 часа. Активность экстрагируемой каталазы под действием КС плавно снижалась на протяжении 1–1,5 часов на 40 %, а затем сравнительно быстро – за 30–40 минут – возвращалась к контрольному значению. Пероксидазная активность (по о-дианизидину), в отличие от двух других показателей окислительного статуса, в первые 50–60 минут после КС не изменялась. Затем происходило быстрое увеличение активности фермента на 50–60 %, и этот уровень был постоянным до 4 часов. Для всех исследованных процессов облучение растений низкоэнергетическим ДКС снижало эффект КС на 50 % и более, что, по-видимому, свидетельствует об их фитохромной природе.

Обсуждаются возможные пути взаимодействия двух сигнальных систем.

С3.5

РОЛЬ ФИТОХРОМНОЙ И КРИПТОХРОМНОЙ СИСТЕМ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЛИСТЯХ КУКУРУЗЫ

**ПОПОВ В.Н., ЕПРИНЦЕВ А.Т., ФЕДОРИН Д.Н.,
КАРПЕЧЕНКО Н.А.**

Воронежский государственный университет; 394006, г. Воронеж,
Университетская пл. 1.
E-mail: bc366@bio.vsu.ru; Тел.: +74732208877

На свету энергетические потребности растения полностью перекрываются за счет работы фотосинтетической ЭТЦ, обуславливая резкое снижение интенсивности функционирования цикла Кребса в данных условиях, о чем и свидетельствует уменьшение активности ферментов этого пути. Неполное выключение ЦТК на свету, может указывать на участие данного цикла в поставке интермедиатов для конструктивного метаболизма. В связи с этим, интересным представляется изучение механизмов регуляции ключевых ферментов цикла Кребса различными рецепторными системами растительной клетки, в частности, маркерного энзима – сукцинатдегидрогеназы (КФ. 1.3.99.1).

В качестве объектов исследования использовали 14-дневные проростки *Zea mays*. Активность СДГ определяли спектрофотометрически. Функционирование СДГ идентифицировали по экспрессии гена *sdh1-2*. Установлено, что активность СДГ в значительной степени зависит от условий освещения. Изучен механизм световой регуляции функционирования СДГ в листьях кукурузы посредством фитохромной и криптохромной систем. Показано, что ингибитором активности СДГ является активная форма фитохрома, о чем свидетельствует резкое снижение активности исследуемого фермента и уровня экспрессии гена *sdh1-2* при облучении растений красным светом (660 нм). Дальний красный свет (730 нм.) не вызывало изменений в интенсивности функционирования СДГ. Воздействие синего света (450 нм) на зеленые растения кукурузы приводило к резкому снижению активности СДГ уже через 15–20 минут облучения. Однако в последующие 3 часа активность исследуемого фермента возрастала и к шестому часу экспозиции составляла 70 % от контроля (24 часа в темноте).

То. полученные данные позволяют заключить, что в регуляции активности сукцинатдегидрогеназы зеленых листьев кукурузы принимает участие фитохромная система. Активная форма фитохрома снижает активность СДГ, что является одним из механизмов регуляции энергетического метаболизма растительной клетки. Ингибирование исследуемого фермента синим светом уже в первые 15 минут, вероятно, является следствием его воздействия на ФАД, входящий в состав каталитической субъединицы СДГ.

**ДВУХКОМПОНЕНТНАЯ СИСТЕМА ФИТОХРОМНОЙ
РЕГУЛЯЦИИ УСТЬИЧНЫХ ДВИЖЕНИЙ****КОЧЕТОВА Г.В., КОНСТАНТИНОВА С.В., БАШТАНОВА У.Б.**

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992,
Россия
E-mail: urtica@gala.net; Тел.: +7-495-939-54-87

В исследовании показано наличие К/ДК-обратимого устьичного ответа у бесхлорофильного мутанта гороха *XL18* [1, 2]. Такая обратимость является отличительным признаком физиологических ответов, регулируемых фитохромом [3]. Для более чёткого доказательства участия фитохрома в процессе были исследованы дозовые зависимости устьичных ответов от интенсивности красного света (КС) различных длин волн (после темновой адаптации) и дальнего красного света (ДКС) (после темновой адаптации и предосвещения КС). Получен предварительный спектр действия устьичных движений в К-ДК области, имеющий максимум для открывания устьиц на КС в районе 660–670 нм и максимум для закрывания на обрабатывающий ДКС около 730 нм. Такой спектр действия характерен для ответов, обусловленных фитохромом В. Однако нелинейность дозовых зависимостей устьичного ответа на ДКС (открывание при низких интенсивностях и закрывание при высоких) свидетельствует об участии в процессе, как минимум, двух компонентов фитохромной системы: первый вызывает К/ДК-обратимые ответы, второй – сонаправленные ответы при действии КС и ДКС и обладает большей чувствительностью. При увеличении длительности темновой адаптации вклад последнего увеличивается. Это позволяет соотнести первый компонент с фитохромом В, для которого характерны фотостабильность и К/ДК-обратимые ответы LFR типа, а второй – с фитохромом А, для которого характерны необратимые ответы VLFR и HIR типов [3] и фотоллабильность – фитохром А разрушается на свету и затем ресинтезируется в течение темновой адаптации [4]. Таким образом, в прямой регуляции светом устьичных движений у гороха участвуют оба главных фитохрома растений: фитохром А и фитохром В.

1. Гостимский С.А., Карвовская Е.А., Синещёв В.А., Беляева О.Б. // Генетика, 1982, 18(1), 124-126.

2. Sokolskaya S.V., Sveshnikova N.V., Kochetova G.V., Solovchenko A.E., Gostimski S.A., Bashtanova O.B. // Functional Plant Biology, 2003, 30, 1249-1259.

3. Shinomura T. // J. Plant Res., 1997, 110, 151-161.

4. Weller J.L., Nagatani A., Kendrick R.E., Murfet I.C., Reid J.B. // Plant Physiology, 1995, 108, 525-532.

**ВЛИЯНИЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ
ПРОТЕИН ФОСФАТАЗ НА СОСТОЯНИЕ ПУЛОВ ФИТОХРОМА А
В КОРНЯХ КУКУРУЗЫ *ZEA MAIS* L.**

КОППЕЛЬ Л.А., ОРЕХОВА Е.А., СИНЕЩЁКОВ В.А.

Биологический факультет Московского Государственного Университета
им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992, Россия
E-mail: Koppel@zmail.ru; Тел.: +7-495-939-54-89

Фитохром А (phyA) представлен в клетке двумя нативными популяциями, phyA' и phyA'', содержание которых зависит от вида растения, органа/ткани, его физиологического состояния. Они различаются по N-концевому участку молекулы и эта дифференциация включает в себя пост-трансляционную модификацию фоторецептора, вероятно, фосфорилирование [1]. Для изучения возможной связи состояния фитохрома А с активностью фосфатазной/киназной системы клеток были использованы неспецифические ингибиторы протеин фосфатаз: щелочных – фенилметилсульфонил фторид (PMSF) и кислотных – натрия фторид (NaF). Свойства фитохрома А и содержание его пулов в клетке прослеживали с помощью разработанного в нашей группе метода флуоресцентной спектроскопии и фотохимии фитохрома *in vivo*. В качестве объекта исследования использовали кончики корней кукурузы сорта Кубанская, инкубированные в растворах ингибиторов с разной длительностью экспозиции. Установлено влияние указанных ингибиторов на соотношение пулов фитохрома А со смещением равновесия между ними в сторону минорного и относительно более стабильного phyA'. При этом время достижения эффектов и их глубина, а также их обратимость зависели от типа ингибитора. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что состояние фитохрома А и равновесие его нативных популяций в клетке связано, прямо или опосредовано, с активностью ее фосфатазной/киназной системы.

Исследования поддержаны грантом РФФИ № 08-04-01453

Литература:

1. Sineshchekov V.A. Photochem. Photobiol Sci., 2004, 3(6), 596-607.

СЕКЦИЯ 4

Фотодинамическая терапия, фотофизика и фотохимия биомолекул

Тезисы докладов

Д4.1

АНАЛИЗ ПРОЦЕССОВ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ НАНОКРИСТАЛЛОВ В КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

**Вадим РЕШЕТОВ¹, Татьяна ЗОРИНА¹, Иван ХЛУДЕЕВ¹,
Михаил АРТЕМЬЕВ², Владимир ЗОРИН¹**

¹Белорусский государственный университет, Минск, 220030, Беларусь
E-mail: vpzozin@mail.ru; Fax: +375-17-2095440

²НИИ прикладных физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, 220030, Беларусь

Одной из основных проблем, стоящих перед практическим использованием флуоресцирующих полупроводниковых нанокристаллов - квантовых точек (КТ) в биологических и медицинских целях, является получение наночастиц с заданными физико-химическими свойствами, обеспечивающими как возможность их введения в водные растворы, так и специфичность взаимодействия с определенными молекулярными, клеточными и тканевыми структурами. В данной работе исследованы полупроводниковые нанокристаллы CdSe/ZnS, поверхность которых была модифицирована меркаптоундекановой кислотой, глутатионом или полиэтиленгликолем для придания им гидрофильных свойств. Методами проточной цитофлуориметрии проанализированы процессы накопления КТ в клетках крови здоровых доноров и больных миелобластным лейкозом. Показано наличие специфичности связывания нанокристаллов с лейкохимическими клетками, степень окрашивания которых в 2,0–3,5 раза выше в сравнении с нормальными мононуклеарными клетками крови. Сравнение процессов окрашивания клеток крови в различных условиях показало, что скорость и равновесный уровень накопления нанокристаллов всеми исследованными типами клеток сильно зависят от режимов мечения, в том числе концентрации белков плазмы и изменений ионной силы среды инкубирования. Добавление в среду инкубирования эмбриональной сыворотки приводит к замедлению процессов накопления КТ в клетках. При этом важным является не только уровень концентрации добавляемых белков, но и величина интервала времени предварительного инкубирования КТ с ними. Увеличение длительности предварительного инкубирования до 2 часов приводит к снижению равновесного уровня накопления КТ более чем в 10 раз. Полученные данные показывают, что связывание КТ с белками плазмы оказывает значительное влияние на процессы их взаимодействия с клетками. С использованием техники гель-хроматографии и спектрально-флуоресцентного анализа исследованы характеристики связывания КТ с отдельными белками плазмы, устойчивость комплексов и стехиометрия комплексообразования. Согласно полученным результатам основная часть КТ образует комплексы с ЛВП и альбумином и лишь небольшое количество КТ связывается с ЛНП. Исследование гель-хроматограмм растворов альбумина, содержащих различное количество белка, показывает, что одна КТ может связывать большое число молекул альбумина. Количественная оценка содержания белка во фракциях, в которых выходят КТ, показывает, что на одну КТ может приходиться свыше 10 молекул альбумина. Результаты исследования позволяют заключить, что белки плазмы эффективно взаимодействуют с КТ, образуя устойчивые комплексы. Состав и количество связанных с КТ белков зависят от размеров и свойств поверхности нанокристаллов и, в значительной степени, определяют механизмы взаимодействия и локализации КТ в клеточных системах.

Д4.2

НАНОЧАСТИЦЫ 5ВЕИ 39, ПОЛУЧЕННЫЕ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ R-ФИКОЭРИТРИНА: ОПТИЧЕСКИЕ, ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ

О.Д. БЕКАСОВА

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Россия, 119071, Москва, Ленинский пр, 33
E-mail: bekasova@bk.ru

Разработаны простые методы получения стабильных наночастиц Ag и CdS размером $3 \pm 0,2 \times 6 \pm 1,82$ нм в водном растворе R-фикоэритрина. Пигмент красных водорослей, R-фикоэритрин – сложный высокомолекулярный белок, содержащий линейные тетрапирролы в качестве простетических групп. Привлекательность R-фикоэритрина, как матрицы для синтеза наночастиц в том, что в центре всех молекул имеются совершенно одинаковые туннельные полости $3,5 \times 6$ нм, которые ограничивают размеры наночастиц, препятствуя их разрастанию.

Результаты исследования размеров, структуры, оптических свойств наночастиц Ag и CdS методами электронной микроскопии, абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии, ВЭЖХ позволяют рассматривать R-фикоэритрин как универсальную матрицу для синтеза одномерных наночастиц.

Обнаружено, что интенсивность флуоресценции наночастиц серебра в фикоэритрине на порядок выше, чем в других матрицах. Это уникальное свойство наночастиц Ag, полученных в растворе R-фикоэритрина может быть востребовано развивающимися наноэлектроникой и голографией.

Известно, что фикобилиновые пигменты способны генерировать синглетный кислород и более эффективны в фотодинамической терапии, по сравнению с широко применяемыми производными гематопорфирина. Фотодинамический эффект фикоэритрина в комплексе с фотохимически активным полупроводником CdS может существенно увеличиться. Вывод основывается на результатах исследования в модельных системах фотохимических свойств наночастиц CdS, стабилизированных фикоэритрином. Обнаружено, что фотохимическая активность композита CdS/фикоэритрин, существенно выше, по сравнению с таковой фикоэритрина. Нельзя исключить, что ценные прикладные свойства наночастиц Ag и CdS в фикоэритрине обусловлены тесным контактом наночастиц с хромофорными группами пигмента.

Д4.3

АМБУЛАТОРНАЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ РАКА КОЖИ С ХЛОРИНОВЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ

**Виолета ПУРЦХВАНИДЗЕ¹, Александр РАДАЕВ¹,
Евгений СТРАНАДКО²**

¹Городская поликлиника №84 Управления здравоохранения ЮЗАО г.Москвы,
117303, Москва, ул.Азовская, д.20, корп.1

E-mail: mail@magicray.ru

²ФГУ “Государственный научный центр лазерной медицины” Росздрава, 121165,
Москва, ул.Студенческая, д.40, стр.1

Рак кожи – одна из распространенных форм злокачественных новообразований среди населения земного шара. Во всем мире отмечается неуклонный рост заболеваемости и смертности от рака данной локализации. В России рак кожи с 2003 г. по частоте занимает 2-е место среди всех злокачественных новообразований, уступая только раку легкого. На сегодняшний день для лечения рака кожи предложено достаточно много методов, но ни один из традиционных методов не дает 100 % излечения. Частота развития рецидивов в течение 3 лет по окончании лечения составляет от 8,4 до 48 %. За последнее десятилетие ФДТ стала одним из альтернативных методов лечения рака кожи, обеспечивающих высокую степень выздоровления и отличные косметические результаты при значительной экономической эффективности. Наиболее распространенными фотосенсибилизаторами в настоящее время являются производные гематопорфирина (Фотофрин, Фотогем, $\lambda = 630$ нм). Однако фотосенсибилизаторы первого поколения имеют целый ряд недостатков: малую глубину проникновения возбуждающего света, что ограничивает их сферу применения; длительную кожную фототоксичность; низкую энергию поглощения возбуждающего красного света. Последнее десятилетие интенсивно разрабатываются фотосенсибилизаторы второго поколения с коротким сроком выведения из организма и большей длиной волны возбуждающего света ($\lambda = 662$ нм), что обеспечивает глубокое проникновение в биологические структуры. Такими фотосенсибилизаторами являются хлориновые производные российского производства Радахлорин и Фотодитазин, а также белорусский препарат Фотолон, имеющие соответствующие разрешения для клинического применения. Нами накоплен опыт применения фотосенсибилизаторов второго поколения из группы хлориновых производных для фотодинамической терапии (ФДТ) рака кожи в амбулаторных условиях. Дозы Радахлорина и Фотодитазина составляли 0,6–0,8 мг/кг, лекарственно-световой временной интервал (ЛСВИ) – 1 и 3 часа, соответственно, доза подводимой световой энергии – от 100 до 200 Дж/см². Доза Фотолона составляла 1,2–1,5 мг/кг, ЛСВИ – 3 часа, доза подводимой световой энергии – от 150 до 200 Дж/см². ФДТ рака кожи с хлориновыми производными в амбулаторных условиях является удобным и эффективным методом, обеспечивающим хорошие функциональные и косметические результаты.

Д4.4

**ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ КАК ОПУХОЛЕВЫЕ МАРКЕРЫ
ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ
НОВООБРАЗОВАНИЙ МЕТОДОМ ДИФFUЗИОННОЙ
ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ТОМОГРАФИИ**

**Марина ШИРМАНОВА^{1,2}, Елена ЗАГАЙНОВА¹,
Ирина БАЛАЛАЕВА^{2,3}, Марина СИРОТКИНА¹, Анна ОРЛОВА³,
Михаил КЛЕШНИН³**

¹Нижегородская государственная медицинская академия,
пл. Минина и Пожарского, 10/1, Нижний Новгород, 603005, Россия
E-mail: Shirmanovam@mail.ru; Тел: +7-831-465-40-60

²Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского,
Нижний Новгород, 603950, Россия

³Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород, 603950,
Нижний Новгород, Россия

Работа посвящена оценке возможности прижизненной визуализации экспериментальных опухолей на установке для диффузионной флуоресцентной томографии (ДФТ) с применением в качестве опухолевых маркеров органических фотосенсибилизаторов.

Работа выполнена на установке для ДФТ, разработанной в ИПФ РАН (Нижний Новгород, Россия). Моделью неоплазии служили перевивные опухоли мышей: карцинома легких Льюис, рак шейки матки. Фотосенсибилизаторы (фотосенс, аласенс, фотодитазин) вводили в терапевтических дозах внутривенно или перорально. ДФТ-изображения получали до введения препарата, затем каждые 30 мин в течение 6 ч, а также через 24 ч.

Получены ДФТ-изображения экспериментальных опухолей *in vivo* с использованием фотосенсибилизаторов. Продемонстрирована возможность прижизненного наблюдения распределения фотосенсибилизаторов в организме животного. Отмечены различия флуоресцентных свойств и динамики накопления фотосенсибилизаторов в опухолевой ткани. Наиболее яркие изображения опухоли получены с применением фотосенса. Результаты подтверждены спектрометрией изолированных органов и тканей и соответствуют данным литературы.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (№№ 07-02-01262, 07-02-01146, 08-02-99049), Федерального Агентства по Науке и Инновациям (проект № 02.522.11.2002) и программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине».

Д4.5

**ФОТОИНДУЦИРОВАННОЕ ТУШЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ
ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФОРМ ПОРФИРИНОВ В ЛИПИДНЫХ
ВЕЗИКУЛАХ И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРИ АНАЛИЗЕ
ФАРМАКОКИНЕТИКИ**

**Д.С. КОЧЕТКОВ^{1,3}, С. Л. СОСНОВСКИЙ², В.П. ЗОРИН¹,
Л.Н. БОЛОТИНА³**

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

E-mail: dmitrykochetkov@gambler.ru; Тел.: +375295016042

²Высшая школа физики и промышленной химии, г.Париж, Франция

³Центр Алексис Ватрен, г.Нанси, Франция

Применение малых униламеллярных везикул является перспективным методом введения фотосенсибилизатора второго поколения мета-тетра(гидроксифенил)хлорина (мТГФХ) в организм при проведении фотодинамической терапии. Использование липосомальных форм мТГФХ позволяет избежать проблем, связанных с нерастворимостью данного фотосенсибилизатора в водной среде, и значительно улучшить его фармакокинетические характеристики. Развитие техники использования липосомальных форм мТГФХ предполагает детальное исследование его фотофизических характеристик в липидных везикулах. Целью данной работы было изучение влияния фотооблучения на фотофизические характеристики липосомальных форм мТГФХ. Нами был обнаружен и изучен процесс фотоиндуцированного тушения флуоресценции мТГФХ в составе липидных везикул. Установлено, что данный эффект возникает в условиях высокой эффективности процессов переноса энергии между молекулами красителя и связан с образованием небольших количеств нефлуоресцирующих продуктов фотоокисления мТГФХ. На основании анализа спектральных характеристик продуктов фотоокисления мТГФХ произведена деконволюция спектров поглощения липосомальных форм мТГФХ при различных дозах облучения. Получены кинетические кривые, характеризующие процесс фотодеградаци и накопления продуктов окисления мТГФХ в везикулах. Полученные результаты представляют интерес при анализе распределения мТГФХ в биосистемах, а также при разработке наноразмерных структур, биосенсоров с контролируемыми свойствами.

Д4.6

**УФ-СВЕТ И АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА
КАК МОДУЛЯТОРЫ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО
СОСТОЯНИЯ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА**

Марина НАКВАСИНА, Олеся ЛИДОХОВА, Мария ТРУБИЦЫНА, Людмила ПОПОВА, Валерий АРТИУХОВ

Воронежский государственный университет, Воронеж, 394006, Россия
E-mail: avg@main.vsu.ru; FAX: 8(4732)208-308

Исследованы изменения цитотоксической активности, антителообразующей и ФНО-продуцирующей способности, экспрессии поверхностных рецепторов (CD8, CD3, CD19, CD56, Fc), уровня вторичных мессенджеров – цАМФ и ионов кальция лимфоцитов крови человека после воздействия УФ-света (240–390 нм) в дозах 75,5÷1510 Дж/м² и в условиях экзогенной генерации активных форм кислорода.

Обнаружено корректирующее действие УФ-излучения на цитотоксическую активность лимфоцитов по отношению к клеткам асцитной карциномы Эрлиха. Установлена взаимосвязь типов модификаций компонентов плазматической мембраны с уровнем функциональной активности лимфоцитов. Показано, что УФ-свет индуцирует снижение уровня вторичного мессенджера цАМФ в цитозоле фотомодифицированных клеток. Выявлено, что УФ-облучение вызывает стимулирование антителонезависимого механизма цитотоксичности лимфоцитов, связанного с активацией Т-клеток, и ингибирование антителозависимого механизма цитотоксической активности.

На основании анализа экспериментальных и литературных данных предложена схема возможного модулирующего действия УФ-света на структурно-функциональные свойства лимфоцитов человека.

Установлено, что супероксидный анион-радикал, пероксид водорода, гидроксильный радикал оказывают инактивирующее воздействие на большинство показателей структурно-функционального состояния исследуемых клеток.

Таким образом, УФ-свет (75,5÷1510 Дж/м²) и АФК (O_2^- , OH, H₂O₂) выступают в роли агентов, избирательно модулирующих структурно-функциональное состояние отдельных компонентов лимфоцитарных клеток, и, тем самым, регулирующих уровень интенсивности иммунного ответа.

Д4.7

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ВОДОРОДА НА ФОТОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МЕМБРАН ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ

С.К. ПИРУТИН¹, В.Б. ТУРОВЕЦКИЙ², Ю.Б. КУДРЯШОВ²

¹ИТЭБ РАН, Пущино, Московская область, 142290, Россия

E-mail: pirutin@yandex.ru

²Кафедра биофизики биологического факультета МГУ, Москва, 119899, Россия

Актуальность проблемы воздействия УФ-излучения на клетки и способов модификации чувствительности, последних к этому излучению, определяется антропогенным загрязнением атмосферы и увеличением сферы медицинской активности применения указанного воздействия. Наибольшей биологической активностью обладает средневолновое УФ-излучение, способное даже в низких дозах оказывать повреждающее действие на субклеточные структуры. Различные воздействия на клетки часто сопровождаются изменением внутриклеточной концентрации ионов водорода, что играет важную роль в формировании функционального ответа клеток на эти воздействия и реализации их повреждающего эффекта.

Объектом исследования служили перитонеальные макрофаги мышей. Работа проведена с использованием микрофлуориметрического метода анализа одиночных клеток с помощью флуоресцентных зондов.

Проведенные нами исследования показали, что как при изменении внеклеточного рН и как следствие — внутриклеточного, так и при изменении только внутриклеточного в результате действия Na^+/H^+ -ионофора моненсина и блокатора Na^+/H^+ -обменника ЭИПА происходят выраженные изменения чувствительности макрофагов к повреждающему действию УФ излучения. При облучении клеток с подкисленным внутриклеточным содержимым, с помощью ЭИПА, сопровождается достоверным снижением эффективности повреждения по сравнению с таковым при стандартной среде инкубации (рН 7,2). Снижение рН среды инкубации до 6,3 так же приводит к уменьшению эффективности УФ-индуцированного повреждения. Повышение внутриклеточного рН, при введении моненсина или подщелачивании внеклеточной среды (до величины рН, равной 8,4), сопровождается повышением чувствительности клеток к повреждающему действию УФ излучения. Также обнаружено, что УФ излучение приводит к подкислению внутриклеточного содержимого, а клетки, выжившие после облучения, имеют рН меньше по сравнению с контрольными клетками. Снижение рН обсуждается как адаптационный ответ клеток на облучение.

**ФОТОРАЗЛОЖЕНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА
ХЛОРОФИЛЛОМ И МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСАМИ ПОРФИРИНОВ****НЕВРОВА О.В., ЛОБАНОВ А.В., КОМИССАРОВ Г.Г.**

Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук,
Москва, ул. Косыгина 4, 119991, Россия;
E-mail: neova@mail.ru

Проведено кинетическое исследование темного и фотозависимого разложения H_2O_2 в условиях катализа хлорофиллом (MgХл), металлокомплексом тетрафенилпорфирина (CuТРР, СгТРР) и фталоцианина (MnPc), нанесенными на силикагель. Изучение этих процессов важно для разработки модельных фотосинтезирующих систем, а также для понимания механизмов функционирования фотосинтетических пигментов *in vivo*.

Во всех изученных системах процессы разложения H_2O_2 описываются уравнением (псевдо)первого порядка по H_2O_2 . Под действием видимого света активность Хл и CuТРР в расходе H_2O_2 падала с увеличением степени заполнения пигментом поверхности зерен силикагеля (a) от 0,2 до 8 мкмоль/г. Эффективные константы скорости разложения пероксида водорода ($k_{\text{эф}}$) при фотокатализе Хл составили $1.83 \cdot 10^{-3} \text{ c}^{-1}$, $1.66 \cdot 10^{-3} \text{ c}^{-1}$, $1.29 \cdot 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ соответственно. Вероятно, с увеличением a координированию молекулы пероксида водорода ионом металла катализатора начинает препятствовать стерический фактор. СгТРР проявлял наибольшую фотокаталитическую активность при степени заполнения пигмента $a = 7,87$ мкмоль/г силикагеля ($k_{\text{эф}} = 3.65 \cdot 10^{-3}$), что, возможно, связано с образованием активных агрегатов. В отсутствие освещения каталитическая активность комплексов снижалась, например, для СгТРР на 40 %.

Рассмотрена возможность передачи электрона от пероксида водорода к акцептору (на примере метилового красного) в процессе окисления H_2O_2 при участии исследуемых фотокатализаторов. В условиях эксперимента происходило восстановление акцептора. В отсутствие H_2O_2 активность катализаторов была незначительной или не наблюдалась. Подтверждено образование формальдегида в трехкомпонентной системе $\text{H}_2\text{O}_2 - \text{НСО}_3^- - \text{Хл}$ под действием видимого света, и показано, что концентрация образующегося формальдегида растет с увеличением степени заполнения Хл поверхности подложки. Таким образом, H_2O_2 способен выступать донором электронов в фотокаталитических системах на основе природного пигмента фотосинтеза.

Работа выполнена при поддержке гранта НШ-5236.2006.3., программы Президиума РАН №18 «Происхождение и эволюция биосферы».

Д4.9

ЭФФЕКТ УФ-ИНДУЦИРОВАННОЙ ФОТОДЕГРАДАЦИИ НА АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА МЕЛАНИНОВ

Александр ДОНЦОВ¹, Виктория ЛАПИНА²

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 119991, Россия
E-mail: adontsovpnick@yahoo.com; FAX: 8-495-137-41-01

²Институт физики им. Б.И. Степанова НАНБ, Минск, 220200 Беларусь

Хорошо известна защитная роль меланиновых пигментов от повреждающего действия окислительных свободнорадикальных процессов. Однако с возрастом происходит значительное уменьшение концентрации меланина в клетках, которое может быть связано с фотодеструкцией пигмента в окислительных процессах. Недавно было показано, что УФ-А облучение меланосом быка в течение более чем 600 часов, действительно приводит к потере их антиоксидантной активности (АОА). В настоящей работе исследовано влияние полного облучения лампы ДРК-120 (большая часть испускания которой приходится на диапазон волн 270–320 нм) на АОА синтетических меланинов и меланосом глаза быка. АОА активность измеряли по способности меланинов тушить хемилюминесценцию люминола и по их способности ингибировать процесс пероксидации липидов. Показано, что экспозиция меланинов в этих условиях в течение 7 ч., приводит к увеличению их оптической плотности, возрастанию сигнала ЭПР и повышению константы тушения хемилюминесценции люминола. Ингибирующая способность меланинов после их облучения в течение 7 ч. в отношении пероксидации липидов остается неизменной. Результаты показывают, что синтетический меланин и меланосомы быка, в отличие от низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбат, глутатион и др.) проявляют высокую устойчивость к действию коротковолнового УФ облучения.

**ФОТОХИМИЯ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ
И ЕЕ КОФЕРМЕНТНЫХ ФОРМ****Ю.Л. ВЕЧТОМОВА, Т.А. ТЕЛЕГИНА, М.П. КОЛЕСНИКОВ,
А.В. УМРИХИНА, Е.А. СВИРИДОВ, М.С. КРИЦКИЙ**

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071, Россия;
E-mail: vechtomova@inbi.ras.ru; FAX: +7-495-954-27-32

Интерес к фотохимическим свойствам фолиевой кислоты (ФК) и ее производных определяется тем, что одно из них – 5,10-метенилтетрагидрофолат (МТГФ), известное как ключевой кофермент «темнового» метаболизма С1-групп, является также светособирающей антенной в составе фоточувствительных белков (ДНК-фотолиаз, криптохромонов). Выявление фотохимических свойств соединений этой группы важно также для разработки фотохимических технологий синтеза лекарств на основе производных фолиевой кислоты.

Показано, что возбуждение ФК УФ-светом ртутной лампы со светофильтром УФС-6 (300–380 нм) в бескислородных условиях и в присутствии доноров электрона (ЭДТА, цистеин, НАД·Н, гликолат, глиоксалаат и др.) приводит к ее фотовосстановлению в дигидро- и, далее, тетрагидроформу (ДФК и ТГФК). Методом ЭПР показано образование в присутствии донора электрона свободных радикалов ФК. Поскольку возбуждение НАД·Н в этих условиях также приводит к образованию радикалов, совместное фотовозбуждение ФК в присутствии НАД·Н приводит к повышению выхода ее восстановленных форм. Скорости реакций формилирования ТГФК с образованием в МТГФ и ее трансформации в 5-формил-ТГФК не проявляли чувствительности к свету.

Показано, что МТГФ устойчив к действию УФ-А излучения. В аэрированном водном растворе фотолиз МТГФ практически не происходит. Протонирование птеринового гетероцикла и наличие положительно заряженного имидазолинового кольца в молекулы, препятствуют окислению и фотолизу МТГФ. Поскольку химическая стабильность молекулы при воздействии на неё света является важным условием работы «антенны», предположено, что это свойство МТГФ в сочетании с высоким коэффициентом поглощения ($\kappa_{360} = 25100 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), могли служить положительным селективным признаком при эволюционном отборе МТГФ на роль светособирающей антенны в ДНК-фотолиазах и криптохромах.

Поддержано грантами РФФИ 07-04-42600-а и 06-04-90599-БНТС-а.

Д4.11

ФОТОХИМИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ПРЕДБИОЛОГИЧЕСКОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

Т.А. ТЕЛЕГИНА, М.П. КОЛЕСНИКОВ, М.С. КРИЦКИЙ.

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071, Россия
E-mail: telegina@inbi.ras.ru; Факс (+7-495) 9542732

Ключевая роль аденозин-5-трифосфата (АТФ) в метаболизме клетки дает основание полагать его важную роль в метаболизме протобионтов. Проблема абиогенного синтеза АТФ, как и его биосинтез в организмах, включает два принципиальных аспекта: образование нуклеотидной структуры (5-АМФ) и присоединение макроэргических фосфорильных остатков. Нами разработана модель абиогенного синтеза 5-АМФ в результате термотрансформации (85°C) в бескислородной среде смеси рибозы, бикарбоната, формиата, глутамина, аспарагиновой кислоты и глицина, т.е. набора предшественников этого нуклеотида при его биосинтезе в клетке.

Показано, что в абиотической среде существовали разнообразные возможности эффективной фотохимической регенерации терминальной фосфорильной группы в молекуле АТФ, т.е. предбиологического прототипа фотофосфорилирования. Воздействие UVA на АДФ, сорбированный на поверхности частиц глинистого минерала, приводило к фосфорилированию его молекул ортофосфатом с выходом АТФ (по рибозе) около 40 %. Выход АТФ при фосфорилировании АМФ в аналогичных условиях составлял 5 %. В другой модели синтез АТФ с выходом 30 % проходил в результате воздействия UVA, либо света видимой (синей) области спектра на раствор АДФ и ортофосфата в присутствии флавопротеиноидных микросфер, т.е. структур, формирующихся в водной среде из продуктов абиотической терموконденсации смеси Глу, Гли и Лиз и состоящих из абиогенных аминокислотных полимеров и флавинов. Фосфорилирование АМФ в этих условиях до АТФ проходило с выходом 10 %. Система функционировала как при доступе воздуха, так и в бескислородной среде (в присутствии H_2O_2 , либо альтернативного кислороду акцептора электронов). В основе фосфорилирующего механизма лежит, по-видимому, фотокаталитический механизм, в котором взаимодействуют свободнорадикальные молекулы флавина и АДФ.

Поддержано программой РАН П-18 и грантом РФФИ 07-04-42600-а.

Д4.12

**ФОТОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КИСЛОРОДА
ПРИ ЕГО ПРЯМОМ ЛАЗЕРНОМ ВОЗБУЖДЕНИИ В ОРГАНИЧЕСКИХ
И ВОДНЫХ СРЕДАХ. ПРИМЕНЕНИЕ К АНАЛИЗУ ИК ПОЛОС
ПОГЛОЩЕНИЯ O_2**

Александр КРАСНОВСКИЙ

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071, Россия;
E-mail: phoal@mail.ru

Предполагается суммировать данные, полученные в лаборатории автора в содружестве с ФиРАН и РОНЦ, по окислению ловушек синглетного кислорода, вызванному прямым лазерным возбуждением O_2 в органических и водных средах. Показано, что прямое возбуждение кислорода инфракрасным (765 или 1270 нм) лазерным излучением относительно небольшой мощности (50–700 мВт) приводит к образованию 1O_2 и окислению органических ловушек (Трап) синглетного кислорода. Используя эту схему, из спектров действия фотоокисления ловушек – тетрацена и 1,3- дифенилизобензофурана получены спектры поглощения O_2 в области 700–1300 нм и рассчитаны молярные коэффициенты поглощения растворенных молекул O_2 , соответствующие разным электронным переходам. Подробно изучено влияние растворителей на коэффициент молярной экстинкции, соответствующий полосе поглощения при 1270 нм. Установлено, что рассчитанные по фотохимическим данным относительные значения ϵ_{1270} коррелируют с относительными значениями констант скоростей радиационной дезактивации 1O_2 (k_1) в тех же средах. Существенное до порядка величины отклонение от этой корреляции было обнаружено при исследовании растворов детергентов в H_2O и D_2O . Предполагается обсудить причины этого эффекта.

[1] Красновский А.А., Дроздова Н.Н., Иванов А.В., Амбарцумян Р.Ф. Биохимия, 2003, 68, 1178–1182.

[2] Krasnovsky A.A., Ambatzumian R.V. Chem. Phys. Lett. 2004, 400, 531–535.

[3] Krasnovsky A.A., Drozdova N.N., Roubal Ya.V., Ivanov A.V., Ambatzumian R.V. Chinese Opt. Lett. 2005, 3, S1–S4.

[4] Krasnovsky A.A., Roubal Ya.V., Ivanov A.V., Ambatzumian R.V. Chem. Phys. Lett., 2006, 430, 260–264.

[5] Krasnovsky A.A., Kryukov I.V., Sharkov A.V. Proc. SPIE, 2007, 6535, Q1–Q5.

[6] Krasnovsky A.A. J. Photochem. Photobiol. A: Chem 2008, doi: 10.1016/j.jphotochem. 2007.12.015

ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ГЕМОПРОТЕИНОВ**ОСИПОВ А.Н., СТЕПАНОВ Г.О., ВЛАДИМИРОВ Ю.А.**

Кафедра медицинской биофизики Российского Государственного Медицинского Университета, Москва
E-mail: anosipov@yahoo.com

Оксид азота и его производные обладают уникальными физиологическими свойствами: 1) они могут регулировать кровяное давление в сосудах и 2) участвуют в развитии апоптотических реакций. Среди производных оксида азота ключевая роль принадлежит нитрозильным комплексам гемопротеинов, которые могут связывать и освобождать оксид азота. Более того, нитрозильные комплексы гемопротеинов обладают фоточувствительностью и могут распадаться под действием видимого излучения. В докладе будет продемонстрировано, что действие низкоинтенсивного лазерного излучения может приводить как *in vivo*, так и *in vitro* к распаду нитрозильных комплексов, освобождению оксида азота и проявлению его физиологического действия.

Известно, что оксид азота может увеличивать ферментативную активность гуанилат-циклазы и таким образом регулировать давление в кровеносных сосудах. Так нами показано, что облучение кровеносных сосудов, по которым течет кровь с высоким содержанием нитрозильных комплексов гемоглобина, вызывает расширение сосудов и интенсификацию кровотока.

Другим примером проявления фотохимических свойств нитрозильных комплексов является регуляция пероксидазной активности цитохрома с. Известно, что взаимодействие цитохрома с с анионными фосфолипидами вызывает появление у них пероксидазной активности, которая и определяет в дальнейшем развитие апоптотических реакций. Благодаря изменению строения активного центра в результате образования комплекса с фосфолипидами цитохром с получает возможность взаимодействовать и с оксидом азота и образовывать нитрозильные комплексы. Образование нитрозильных комплексов тормозит пероксидазную активность. Однако, поскольку эти комплексы обладают фоточувствительностью, то они, также, могут разрушаться под действием видимого излучения. При этом восстанавливается пероксидазная активность цитохрома с. Представленные данные свидетельствуют, что образование и фотораспад нитрозильных комплексов могут служить регуляторами важнейших физиологических процессов в организме.

Д4.14

ФОТОДИССОЦИАЦИЯ КОМПЛЕКСОВ ГЕМОГЛОБИНА И МИОГЛОБИНА С МАЛЫМИ ЛИГАНДАМИ O₂, CO, NO

Б.М. ДЖАГАРОВ, С.В. ЛЕПЕШКЕВИЧ

Институт физики им. Б.И. Степанова, Минск 220072, Беларусь
E-mail: bmd@imaph.bas-net.by; FAX: +375-17-284-0879

Известно, что фотовозбуждение комплексов гемоглобина (Hb) и миоглобина (Mb) с двухатомными лигандами O₂, CO и NO приводит к разрыву связи между гемовым железом и лигандом. Реализовав таким образом “мгновенный” разрыв связи Fe-лиганд мы получаем возможность в реальном масштабе времени изучать движение O₂ (CO, NO) внутри белковой матрицы.

В данном докладе будут представлены результаты исследований методами лазерной кинетической спектроскопии высокого и сверхвысокого разрешения механизма и динамики реакций ассоциации - диссоциации перечисленных малых лигандов с Hb и Mb.

Основное внимание будет уделено следующим вопросам:

1. Фотофизические процессы, связанные с внутримолекулярным (внутригемовым) преобразованием энергии возбуждения в лигандированных и нелигандированных формах данных гембелков. Причины отсутствия люминесценции у гема.

2. Квантовый выход фотодиссоциации лигандов. Эффективность и скорость их выхода из белка в среду.

3. Геминальные мономолекулярные стадии связывания лигандов с гемовым железом.

4. Бимолекулярные реакции связывания лигандов.

5. Влияние природных эффекторов на процессы (2), (3), (4).

6. Полное кинетическое описание движения лиганда внутри белка и его роль для понимания кооперативного аллостерического связывания лигандов с Mb и Hb.

Д4.15

БИОСТИМУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ: ФОТОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ИЛИ ФОТОТЕРМИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ?

Ю. А. ВЛАДИМИРОВ

Факультет Фундаментальной Медицины МГУ

В 1994 году мы сформулировали гипотезу о трех фотохимических реакциях, лежащих в основе биологического (стимулирующего) действия низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ). Это – фотодинамическое действие эндогенных порфиринов на биомембраны, фотореактивация клеточной супероксиддисмутазы и фотолиз комплексов гемопротеинов с NO. В дальнейшем эти реакции были подробно изучены в группах Г.И. Клебанова и А.Н. Осипова на кафедре биофизики РГМУ. Позднее в работах О. Лапотко, В. Жарова и других авторов было изучено тепловое (фототермическое) действие импульсных лазеров на эритроциты и лимфоциты. В результате исследований, проведенных в последнее время совместно с М.А. Проскурным (Химфак МГУ) и А.Н. Осиповым (Медико-биологический факультет РГМУ) нами было показано, что при действии биостимулирующих доз лазерного излучения эффекты, наблюдаемые на клетках (фагоциты, эритроциты) и ткани печени, а также в модельных биохимических системах, содержащих гемопротеины и их комплексы, имеют чисто фотохимическую природу, а фототермическое повреждение клеток можно обнаружить лишь при интенсивностях облучения, на два порядка величины превышающие те, при которых наблюдается биостимулирующее действие (при одинаковой длительности облучения). Таким образом, биостимулирующее действие лазерного облучения имеет чисто фотохимическую природу, фототермические эффекты наблюдаются при существенно больших интенсивностях света.

СИНТЕЗ И СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ ПОРФИРИНОВ**Андрей Ф. МИРОНОВ, Михаил А. ГРИН**

Московская государственная академия тонкой химической технологии
им.М.В.Ломоносова, Москва, 119571, Россия
E-mail: mironov@mitht.ru; FAX: +7-495-936-89-01

Современные методы диагностики и лечения онкозаболеваний требуют разработки новых супрамолекулярных структур для комплексного решения целого ряда задач, включая направленную доставку фотосенсибилизаторов (ФС) в опухоль, флуоресцентную диагностику (ФД) и фотодинамическую терапию (ФДТ) рака. Наиболее перспективными с этой точки зрения являются тетрапиррольные соединения, которые способны селективно накапливаться в злокачественных опухолях и интенсивно флуоресцировать под действием света определенной длины волны. К сожалению, собственная флуоресценция хлоринов и бактериохлоринов недостаточно велика, что ограничивает возможности их применения в качестве диагностических агентов. Усиление флуоресцентных свойств ФС на основе природных пигментов обычно достигается двумя путями – либо введением в макроцикл d-металлов, либо присоединением к хлоринам и бактериохлоринам сильных флуорофоров, подобных полиметиновым и индоцианиновым красителям.

В настоящей работе первый подход реализован путем синтеза хлорин-бактериохлоринового димера, содержащего в качестве флуорофора Zn-комплекс хлорина *eб*, ковалентно связанный с циклоимидом бактериохлорина *p* посредством спейсерной группы. Фотофизические свойства полученного димера позволяют решать задачу комбинированного использования подобных ФС для ФД и ФДТ в онкологии.

С другой стороны, для усиления флуоресцентных свойств хлориновых ФС нами осуществлен синтез конъюгатов последних с ди- и трикарбоцианиновыми красителями. В качестве исходных соединений были взяты феофорбид *a* и бактериофеофорбид *a*, в которых пентаноновый экзоцикл раскрывали различными диаминами $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$. Изменение длины полиметиновой цепи в ди- и трикарбоцианинах ($\zeta_{\text{max}} = 643$ и 747 нм, соответственно) и типа гетероцикла (индоленин и бензотиазол) в молекулах красителей, с одной стороны, а также замена хлорина ($\zeta_{\text{max}} = 660$ нм) на бактериохлорин ($\zeta_{\text{max}} = 760$ нм), с другой стороны, существенно влияют на спектральные свойства конъюгата в целом, что связано с внутримолекулярным переносом энергии между пигментом и красителем.

Д4.17

ТРИПТОФАНОВАЯ ФОСФОРЕСЦЕНЦИЯ ЛЕКТИНОВ ПРИ КОМНАТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

**Владимир МАЖУЛЬ, Екатерина ЗАЙЦЕВА,
Александр ТИМОШЕНКО, Инесса ГАЛЕЦ, Татьяна ЧЕРНОВЕЦ**

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Академическая, 27,
Минск, 220072, Республика Беларусь
E-mail: mazhul@biobel.bas-net.by; FAX: +375-284-23-59

Впервые зарегистрирована ТФКТ семи растительных лектинов: sambucus nigra agglutinin-I (SNA-I), laburnum anagyroides lectin (LAL), solanus tuberosus (STA), peanut agglutinin (PNA), pisum sativum agglutinin (PSA), phasesolus vulgaris agglutinin-E (PHA-E), viscum albus agglutinin (VAA). Показано, что кинетика затухания ТФКТ лектинов, в зависимости от количества триптофанилов и особенностей их локализации, удовлетворительно аппроксимируется одной либо двумя экспоненциальными компонентами. Моноэкспоненциальная кинетика затухания ТФКТ наблюдалась у SNA-I, STA, PSA; биэкспоненциальная – у LAL, PNA, PHA-E, VAA. Значения времени жизни (ϑ) ТФКТ SNA-I, STA, PSA варьировали в интервале от 16 ± 2 мс до 1070 ± 40 мс. Значения времени жизни быстрого компонента (ϑ_1) ТФКТ LAL, PNA, PHA-E, VAA составляли от 29 ± 2 мс до 266 ± 7 мс, медленного компонента (ϑ_2) ТФКТ – от 136 ± 10 мс до 500 ± 18 мс.

Обнаружена ТФКТ пяти животных лектинов: галектина из печени цыпленка (CG-16), галектина из печени человека (Gal-3), лактозоспецифического и галактозоспецифического глобулинов, лектина из плазмы крови человека (SAP). Кинетика затухания ТФКТ CG-16 и Gal-3 была моноэкспоненциальна, лактозоспецифического и галактозоспецифического глобулинов, SAP – биэкспоненциальна. Значения ϑ ТФКТ варьировали от 13 ± 3 мс до 120 ± 16 мс; ϑ_1 от $1,5 \pm 0,14$ мс до $6,4 \pm 0,5$ мс; ϑ_2 от 29 ± 2 мс до 82 ± 7 мс.

На основании результатов измерений кинетических параметров ТФКТ сделан вывод о том, что медленная ВМД лектинов животного происхождения существенно лабильна в местах локализации триптофанилов по сравнению с большинством растительных лектинов. Проведен анализ особенностей локализации триптофановых остатков растительных и животных лектинов, идентифицированы триптофанилы, ответственные за миллисекундную ТФКТ белков.

Результаты фосфоресцентного анализа медленной ВМД растительных и животных лектинов сопоставлены с данными изучения их конформационного состояния, проведенного методом стационарной флуоресцентной спектроскопии.

Д4.18

АГРЕГАЦИЯ МЕРОЦИАНИНА 540 (МЦ540) ПРИВОДИТ К ПОВЫШЕНИЮ ФОТОЛАБИЛЬНОСТИ КРАСИТЕЛЯ

**Александр ПОТАПЕНКО, Елена КОЖИНОВА, Татьяна ШМИГОЛЬ,
Андрей ТИХОМИРОВ, Михаил МАЛАХОВ**

Российский государственный медицинский университет, Москва, 117997, Россия;
E-mail: potap@hotmail.com; FAX: +7-495-246-71-75

МЦ540 – анионный краситель, применяемый в качестве флуоресцентного зонда, а также сенсibilизатора в фотодинамической терапии. Известно, что продукты фотоокисления МЦ540 могут индуцировать апоптоз опухолевых клеток [Pergvaiz *et al.*, *Cancer Lett.* 1998, **128**, 11-22] и модулировать Т-клеточное звено иммунитета [Kyagova *et al.*, *Rus. J. Immunol.*, 2002, **7**, 327-334]. В дистиллированной воде в спектрах поглощения МЦ540 наблюдаются два «водных» максимума около 500 и 535 нм, принадлежащие димерам и мономерам красителя. При добавлении солей сначала наблюдается гипохромный эффект без заметных изменений формы спектров поглощения, при концентрациях солей выше критической (ККС) водные максимумы постепенно исчезают и появляется новая полоса около 517 нм. Величина ККС находится по точке перегиба зависимости оптической плотности при 517 нм от концентрации соли [Adenier & Aagon, *Spectrochim. Acta Part A*, 2002, **58**, 543-551].

В настоящем сообщении методами абсорбционной, флуоресцентной спектроскопии и резонансного светорассеяния (РСР) изучено влияние КСI на агрегацию и фотоллабильность МЦ540. Показано, что зависимость величины ККС от концентрации МЦ540 описывается гиперболической функцией. В 10 и 20 мкМ водных растворах МЦ540 величина ККС составляла 0,12 и 0,05 М КСI. Для изучения механизма вызванной добавлением соли агрегации красителя использовали метод регистрации РСР. Известно, что явление РСР проявляется как резкое усиление рэлеевского светорассеяния в области поглощения агрегирующих молекул, если между хромофорами в агрегате возникает сильное экситонное взаимодействие. Спектры РСР были измерены на флуориметре при синхронной развертке возбуждающего и регистрирующего монохроматоров, настроенных на одинаковые длины волн. Эти спектры исправлялись на эффекты внутреннего светофильтра и чувствительность флуориметра. Методом РСР удалось выявить агрегацию МЦ540, когда она еще не обнаруживается спектрофотометрически. Обнаружено, что фотоллабильность МЦ540 убывала в ряду: крупные надмолекулярные агрегаты >> димеры >> мономеры.

Работа поддержана грантами РФФИ №04-04-49626а, 07-04-01060а.

Д4.19

СВОЙСТВА ТРИПЛЕТНЫХ СОСТОЯНИЙ НОВЫХ СЕНСИБИЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ КУМАРИНОВ

**Наталья БРЯНЦЕВА¹, Ирина СОКОЛОВА¹,
Антонина ЦЫРЕНЖАПОВА¹, Владимир ХИЛЯ², Яна ГАРАЗД²**

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

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

Некоторые замещенные кумарина образуют группу лекарственных препаратов. Они в сочетании с УФ-А-излучением (320–400 нм) успешно применяются для лечения многих кожных (витилиго, псориаз и др.) и аутоиммунных заболеваний [1].

Имеются данные о флуоресценции со значительными квантовыми выходами [2] отдельных представителей кумаринов. Известно, что в механизмах фотосенсибилизации определяющую роль играют триплетные состояния молекул. Поэтому нами было уделено особое внимание исследованию свойств триплетных состояний пяти вновь синтезированных замещенных кумарина. Для более детального изучения фотосенсибилизирующих свойств нами были рассмотрены экспериментальные спектры флуоресценции. При комнатной температуре флуоресценция зафиксирована не была. При температуре жидкого азота 77 К удалось впервые для данных соединений снять спектры флуоресценции. Полученные из квантово-химических расчетов теоретические значения длин волн для нижних триплетов совпадают с длинами волн, соответствующими максимумам спектров флуоресценции и с полученными нами ранее данными по спектрам Т-Т-поглощения. Наблюдаемая флуоресценция является достаточно интенсивной. Следовательно, можно сделать предположение о хороших фотосенсибилизирующих свойствах исследуемых соединений.

Работа частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований № 06-08-01380-а.

1. Потепенко А.Я., Малахов М.В., Кягова А.А. // Биофизика. 2004. Т. 49. № 2. С. 322–338.

2. Tatchen J., Marian C. // *J. Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2006, V. 8, 2133–2144.

**ПОЛНОСТЬЮ-ТРАНС РЕТИНАЛЬ И ПРОДУКТЫ
ЕГО ПРЕВРАЩЕНИЯ КАК ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ
В МЕХАНИЗМЕ ПОВРЕЖДАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ СВЕТА
НА МОЛЕКУЛУ ЗРИТЕЛЬНОГО ПИГМЕНТА РОДОПСИНА
НА ФОТОРЕЦЕПТОРНОЙ МЕМБРАНЕ ЗРИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ**

**М.Ю. ЛОГИНОВА¹, В.Э. ЗАГИДУЛЛИН², Е.В. РОСТОВЦЕВА¹,
Т.Б. ФЕЛЬДМАН¹, В.З. ПАЩЕНКО², А.Б. РУБИН²,
М.А. ОСТРОВСКИЙ¹**

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
119334, Москва, ул. Косыгина 4

E-mail: marina.loguinova@mail.ru, 939-7154, 939-7492

²Биологический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова

Поглощение света приводит к изомеризации хромофорной группы родопсина, 11-*цис* ретиналя, в полностью-*транс* форму. В результате полностью-*транс* ретиналь высвобождается из белка и вступает во взаимодействие с аминокгруппами родопсина и фосфолипидов, образуя следующие производные: A2-родопсин, NR-PE, A2-PE и ATR-dimer-PE [1]. Полностью-*транс* ретиналь является эффективным природным фотосенсибилизатором [2].

Нами показано, что производные полностью-*транс* ретиналя. при освещении вызывают повреждение родопсина, нарушая его важнейшее функциональное свойства – способность к регенерации в темноте в присутствии 11-*цис* ретиналя. Также показано, что полностью-*транс* ретиналь, связанный в фоторецепторной мембране с фосфолипидами и родопсином, проявляет меньшую фототоксичность, чем свободный полностью-*транс* ретиналь.

Описаны флуоресцентные свойства свободного и связанного полностью-*транс* ретиналя, исследованы кинетики затухания флуоресценции в пикосекундном диапазоне времен, определено время жизни возбужденного синглетного состояния свободного полностью-*транс* ретиналя, а также производных полностью-*транс* ретиналя

Литература

1. Fishkin N., Jang Y-P, Itagaki Y., Sparrow J.R, Nakanishi K. "A2-Rhodopsin: a new fluorophore isolated from photoreceptor outer segments" *Org.Biomol.Chem.* 2003, 1, 1101-1105
2. Островский М. А. Молекулярные механизмы повреждающего действия света на структуры глаза и системы защиты от такого повреждения. // *Успехи биологической химии.* 2005. Т. 45. С. 173-204

ФОТОРАЗРУШЕНИЕ ФОЛАТОВ**Александр ВОРОБЕЙ¹, Павел ВОРОБЕЙ²**

¹Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, ул. Академическая, д. 27, 220072 Минск, Беларусь
E-mail: avorobey@tut.by; FAX: +375 (17) 2842359

²Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова, ул. Долгобродская, д. 23, 22009 Минск, Беларусь

Фолаты являются фоточувствительными витаминами, разрушающимися при УФ4облучении. Ранее мы показали [1], что в фоторазрушении фолиевой кислоты (ФК) участвует синглетный кислород ($^1\text{O}_2$), генерируемый ее фотопродуктами и инициирующий разрыв связи C9–N10 между птериновым и бензольным кольцами в молекуле ФК. Целью настоящей работы являлось изучение разрушения ФК генерируемым порфиринами $^1\text{O}_2$.

В качестве фотодинамически-активных порфиринов использовали тетрасульфопенилпорфин (ТСФП) и тетраметилпиридилпорфин (ТМПП). При облучении водных растворов ФК ($1 \cdot 10^{-5}$ М) видимым светом в присутствии порфиринов ($2 \cdot 10^{-6}$ М) зарегистрировано появление характерной для птеринов интенсивной флуоресценции с максимумом 445 нм при возбуждении 350 нм. Об определяющей роли $^1\text{O}_2$ в фотосенсибилизируемом порфиринами разрушении ФК свидетельствует резкое ускорение процесса при замене H_2O на D_2O и его выраженное замедление в присутствии перехватчика $^1\text{O}_2$ азид натрия ($1 \cdot 10^{-3}$ М). Положительно заряженный ТМПП проявляет значительно большую фотосенсибилизирующую активность в разрушении ФК по сравнению с несущим отрицательные заряды ТСФП, что связано с электростатическими взаимодействиями сенсибилизаторов с ФК.

Изучение фотосенсибилизируемого разрушения фолатов имеет практическое значение в связи с разработкой фотохимических методов их определения в биологических средах, а также новых методов фотодинамической терапии заболеваний, основанных на фотодеструкции фолатов в пролиферативно-активных клетках.

Список цитируемой литературы

- [1] Vorobey P., Steindal A.E., Off M.K., Vorobey A., Moan J. Influence of human serum albumin on photodegradation of folic acid in solution // Photochem. Photobiol. 2006. V. 82. P. 817–822.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ С ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРАМИ ПЕРВОГО И ВТОРОГО ПОКОЛЕНИЯ

Академик ЛАН РФ, проф. Евгений СТРАНАДКО

ФГУ “Государственный научный центр лазерной медицины” Росздрава, 121165,
Москва, ул. Студенческая, д.40, стр.1
E-mail: seph@mail.ru

Как известно, фотодинамическая терапия (ФДТ) рака определяется введенным в ткани фотосенсибилизатором, который при световом возбуждении передает энергию кислороду образуя синглетный кислород и другие активные формы кислорода, которые разрушают опухолевую ткань. Важным фактором ФДТ является лекарственно-световой временной интервал (ЛСВИ) – период времени от момента введения фотосенсибилизатора до его светового возбуждения. Длительность этого периода определяется моментом максимального накопления фотосенсибилизатора в опухоли или другой патологической ткани, подвергаемой действию ФДТ, и временем выведения значительной части фотосенсибилизатора из здоровых тканей. Этими двумя показателями определяется одна из главных специфических черт фотосенсибилизатора – градиент контрастности, т.е. соотношение концентрации фотосенсибилизатора в опухоли и в нормальных тканях. Для различных фотосенсибилизаторов градиент контрастности колеблется от 1,5–2 до 10–15. Высокий градиент контрастности фотосенсибилизатора позволяет полностью разрушить опухоль и не вызвать необратимых метаболических изменений в окружающих опухоль и подлежащих нормальных тканях. Нам удалось оптимизировать применение для ФДТ большой группы фотосенсибилизаторов, начиная с фотогема (1992 г.), Фотосенса (1994 г.), а затем препаратов хлоринового ряда (Фотодитазин, Радахлорин) и зарубежных фотосенсибилизаторов (Фотолон, Фоскан). Самых впечатляющих результатов нам удалось добиться с Фосканом (темопорфином), который в малых дозах оказался эффективным при наиболее агрессивных видах злокачественных опухолей (меланома, рак легкого), а также рака кожи, обтурирующего рака пищевода и большого дуоденального сосочка. В докладе предполагается рассмотреть общие проблемы ФДТ и результаты собственного экспериментального опыта автора.

Д4.23

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА, ИНДУЦИРОВАННОГО УФ-СВЕТОМ

**Валерий АРТЮХОВ, Марина НАКВАСИНА, Олеся ЛИДОХОВА,
Мария ТРУБИЦЫНА**

Воронежский государственный университет, Воронеж, 394006, Россия
E-mail: avg@main.vsu.ru; FAX: 8(4732)208-308

С целью выяснения механизмов реализации начальных этапов апоптоза иммуноцитов изучены изменения структурно-функционального состояния лимфоцитов периферической крови доноров после их УФ-облучения (240÷390 нм).

При исследовании уровня экспрессии Fas-рецептора (CD95) лимфоцитов человека, запускающего процесс гибели клеток, после их УФ-облучения статистически достоверные отличия величины изучаемого параметра по отношению к контролю зарегистрированы через 3, 4, 5 (151 Дж/м²) и через 1–5 часов после воздействия УФ-света в дозах и 1510 и 3020 Дж/м². В присутствии циклогексимида 10⁻⁴ моль/л снижение уровня CD95 по сравнению с таковым для УФ-модифицированных свободных клеток обнаружено через 4 и 5 часов после облучения лимфоцитов, что свидетельствует о возможности синтеза молекул Fas-рецептора *de novo*.

Через 20 ч после УФ-облучения на электрофореграмме обнаружена «апоптотная лестница», указывающая на реализацию процесса фрагментации ДНК, индуцированного воздействием УФ-света во всех используемых дозах.

Установлено, что УФ-облучение в дозах 151, 1510, 9060 Дж/м² вызывает статистически достоверное уменьшение концентрации внутриклеточного цАМФ лимфоцитов доноров соответственно на 65, 62 и 40 % по сравнению с таковой для нативных клеток. Обнаружено корригирующее действие УФ-света (151 Дж/м²) на уровень внутриклеточного кальция в лимфоцитарных клетках: у доноров с изначально высокой и низкой концентрациями (до облучения) вторичного посредника наблюдается соответственно снижение и повышение изучаемого параметра до нормальных значений.

Полученные результаты указывают на участие аденилатциклазного и фосфоинозитидного механизмов передачи сигнала в лимфоцитарной клетке в процессе реализации рецепторопосредованного пути апоптоза, индуцированного УФ-излучением.

Д4.24

ПРОДУКТЫ ФОТООКИСЛЕНИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ ОБЛАДАЮТ СУПРЕССОРНЫМ ДЕЙСТВИЕМ НА Т-КЛЕТОЧНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ; @ИНА

**Алла КЯГОВА¹, Людмила КОЗЫРЬ¹, Галина МАНСУРОВА¹,
Зоя МОШНИНА², Гелий ПОНОМАРЕВ³, Александр ПОТАПЕНКО¹**

¹Российский Государственный Медицинский Университет, Москва, ул. Островитянова 1, 117997, Россия

E-mail: kyagova_alla@front.ru; FAX: +7-495-246-71-75

²Псориаз-центр, Москва, Россия

³Институт Биомедицинской Химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Псораленовая фотохимиотерапия (ПУВА-терапия) и фотодинамическая терапия (ФДТ) успешно используются для лечения ряда кожных и аутоиммунных заболеваний, обусловленных гиперреактивностью Т-клеточного звена иммунитета. Предполагается, что терапевтический эффект как ПУВА-терапии, так и ФДТ основан на индукции системной иммуносупрессии. Фотохимический механизм супрессорного действия ПУВА-терапии или ФДТ не ясен. Важную роль могут играть реакции типа II [генерация электронно-возбужденным фотосенсибилизатором (ФС) синглетного кислорода, атакующего биологические мишени]. Возможно также участие свободнорадикальных реакций (тип I), кислород-независимое фотоприсоединение ФС к ДНК (тип III, характерен только для ПУВА-терапии) или взаимодействие с биосубстратом продуктов фотоокисления ФС (реакции типа IV).

Нами обнаружено, что продукты фотоокисления фурукумаринов, применяемых при ПУВА-терапии [псорален (Пс), 8-метоксипсорален, 5-метоксипсорален], а также ФС, используемых при ФДТ [мероцианин 540 (МЦ540) и протопорфирин IX (ППИХ)], при их внутривенном или пероральном введении мышам вызывают супрессию реакции контактной чувствительности (КЧ) к гаптенам – модели Т-клеточного иммунного ответа *in vivo*. Выявлено, что в отличие от продуктов фотоокисления ППИХ и МЦ540, в основе иммунного механизма супрессорного действия фотопродуктов Пс лежит активация клеток с со специфическим супрессорным потенциалом. Наши результаты показывают, что, по крайней мере, частично влияние ПУВА-терапии и ФДТ на иммунную систему может осуществляться при участии продуктов фотодеградации фотосенсибилизаторов.

Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ 07-04-01060-а

Д4.25

ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ НЕЙРОНОВ И ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК: СИГНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ

Анатолий УЗДЕНСКИЙ

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, 344090, Россия
E-mail: auzd@yandex.ru; Тел/Факс: 8632-433577

Процессы меж- и внутриклеточной сигнализации играют важную роль в фотодинамическом (ФД) повреждении тканей, состоящих из клеток разных типов. В нервной ткани нейроны и глиальные клетки (ГК) обмениваются нейротрофинами и нейрегулинами, запускающими внутриклеточные сигнальные каскады, которые регулируют их выживаемость. Роль этих процессов в ФД повреждении нервной ткани изучена на примере изолированного механорецепторного нейрона рака, окруженного ГК. ФД воздействие Фотосенса приводило к прекращению нейронной активности, некрозу нейрона и ГК, а также к апоптозу ГК. Экзогенные нейротрофины NGF и GDNF защищали ГК, но не нейроны, от ФД-индуцированного апоптоза, а NGF – также от некроза. Другой нейротрофин BDNF, а также эпидермальный фактор роста EGF были неэффективными. С помощью ингибиторов и активаторов сигнальных белков показано участие кальмодулина, кальмодулин-зависимой киназы II и аденилатциклазы в ФД-индуцированном некрозе нейронов и ГК. В некрозе глии, но не нейронов, также участвовали фосфолипаза C, протеинкиназа C и MAP киназа p38. В апоптозе ГК участвовала фосфолипаза C, но не другие компоненты кальциевого сигнального пути - кальмодулин и кальмодулин-зависимая киназа II. Зато аденилатциклаза, протеинкиназы A и C, и MAP киназа JNK оказывали противоапоптотное действие. Интересно, что экзогенный глутамат, но не его агонист NMDA, также снижал апоптоз глии, причем такое же защитное действие оказывал ингибитор метаботропных глутаматных каналов AP-3. Они не влияли на некроз ГК. Эти данные показывают важность меж- и внутриклеточных сигнальных процессов при ФД повреждении нервной ткани. Причем сигнальные процессы в нейронах и глиальных клетках различны. Их модуляция может позволить селективно воздействовать или защитить нейроны и глиальные клетки от ФД воздействия. Важный результат работы – демонстрация участия некоторых сигнальных путей в управлении некрозом. Это не пассивная, неуправляемая смерть клеток. Как и апоптоз, он может регулироваться различными сигнальными процессами.

Работа поддержана грантами РФФИ 02-04-48027, 05-04-48440 и 08-04-01322.

**ФОТОРЕЦЕПТОРНЫЕ СВОЙСТВА МОЛЕКУЛЯРНОГО
КИСЛОРОДА, РАСТВОРЕННОГО В ПЛАЗМЕ КРОВИ****Станислав ЗАХАРОВ¹, Николай ГОНЧАРОВ², Александр АЛЕХИН²,
Сергей КАЦАЛАП²**¹Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Москва, 119991, Россия

E-mail: stzakhar@sci.lebedev.ru ; FAX: +7-499-13-503-50

²Центральная клиническая больница РАН, Москва, Россия

Кровь играет ключевую роль в сохранении динамической устойчивости организма благодаря выполняемой ею функции транспорта газов, углеводов и других ингредиентов. Как известно, для согласованной работы клеток тканей и органов необходим постоянный приток энергии, поэтому основная масса потребляемых веществ используется в каждой клетке для воспроизводства молекул АТФ. Поскольку кислород поступает в клетки из эритроцитов, их прохождение сквозь капилляры представляет собой критическое звено пополнения энергетики организма, и наиболее вероятной первичной причиной гипоксии является ухудшение эластичности красных клеток. Использование красного света в терапевтическом методе внутривенного лазерного облучения крови (ВЛОК), основой которого является светокислородный эффект [1, 2], приводит к повышению деформируемости эритроцитов [1–3]. Это обстоятельство вызывает естественный интерес к механизму переноса возбуждения на клетки крови при триплет-синглетных переходах в молекулах кислорода. На основе анализа физических, биологических и клинических данных формулируется гипотеза о магнитной природе передачи возбуждений посредством изменений магнитодинамики внеклеточной водной фазы плазмы крови.

1. С.Д. Захаров, А.В. Иванов, Е.Б. Вольф, Ю.П. Тимофеев и др. *Структурные перестройки в водной фазе клеточных суспензий и белковых растворов при светокислородном эффекте*. Квантовая электроника, т. 33, 149–162 (2003)

2. S.D. Zakharov, A.V. Ivanov. *Light-oxygen effect as a physical mechanism for activation of biosystems by quasi-monochromatic light (a review)*. Biophysics. vol. 50, Suppl. 1, 64–85 (2005)

3. С.Д. Захаров, А.В. Иванов, И.М. Корочкин, В.П. Данилов. *Прямое возбуждение фотонами эндогенного молекулярного кислорода – фотофизический акт терапевтического действия лазерного излучения*. Лазерная медицина, т. 10, 4–9 (2006)

**ИНФРАКРАСНЫЙ ЛАЗЕРНЫЙ ФОТОТЕРМОЛИЗ
И ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ КЛЕТОК ПРИ
ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ИЗЛУЧЕНИЯ С ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРАМИ
И ПЛАЗМОННО-РЕЗОНАНСНЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ**

**Георгий АКЧУРИН¹, Гариф АКЧУРИН¹, Ирина МАКСИМОВА¹,
Георгий СЕЛИВЕРСТОВ², Георгий ТЕРЕНТЮК³, Борис ХЛЕБЦОВ⁴,
Николай ХЛЕБЦОВ^{1,4}, Валерий ТУЧИН¹**

¹Саратовский госуниверситет, Саратов, 410012, Россия;

²Саратовский медицинский госуниверситет, Саратов, 410012, Россия

³ИБФРМ РАН, Саратов, 410036, Россия

⁴Первая ветеринарная клиника, Саратов, 410012, Россия.

В настоящее время в ведущих мировых биомедицинских центрах ведется разработка двух технологий лазерного разрушения раковых клеток: фотодинамической терапии и фототермолиза на основе плазмонно-резонансных наночастиц. Механизм фотодинамической инактивации исследовался при основе анализа изменения составного потенциала действия соматического нерва лягушки, прокрашенного фотосенсибилизатором – Индоцианин Зеленым при лазерном облучении (810 нм). Инактивация нейронов с временным миллисекундным разрешением позволила установить, что происходит не только фотоповреждение плазматической мембраны, но и функциональное нарушение работы активного транспорта клетки вследствие повреждения митохондрий.

Технология лазерного фототермолиза на основе функционализированных золотых плазмонно-резонансных наночастиц, может существенно повысить контрастность их селективного накопления в раковых клетках. Использование золотых нанооболочек с ядром из окиси кремния, а также золотых наностержней позволяет настраивать плазмонный резонанс в ИК область прозрачности биотканей (750–1200 нм). В экспериментах на лабораторных животных были оптимизированы режимы работы лазера (810 нм) для управляемого локального нагрева биотканей с определенной концентрацией введенных наночастиц для обеспечения режима некроза или апоптоза. Обнаруженный эффект дефрагментации нанооболочек при воздействии наносекундных лазерных импульсов позволил установить оптимальный диапазон длительности оптических импульсов для минимального повреждения окружающих нормальных клеток.

ИССЛЕДОВАНИЕ НАКОПЛЕНИЯ 5-АЛК ИНДУЦИРОВАННЫХ ЭНДОГЕННЫХ ПОРФИРИНОВ БАКТЕРИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ; @ *HFDA*

Людмила БУНЕГИНА¹, Анна ОРЛОВА^{2,3}, Светлана ЕРМОЛЬЕВА², Елена ЗАГАЙНОВА²

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского, Нижний Новгород, 603950, Россия
E-mail: bunegina@mail.ru; Тел: +7-831-465-40-60;

²Нижегородская государственная медицинская академия, пл. Минина и Пожарского, 10/1, Нижний Новгород, 603005, Россия

³Институт прикладной физики РАН, 603950, ул. Ульянова, д. 46, Нижний Новгород, Россия

Применение 5-аминолевулиновой кислоты (5-алк) позволяет существенно повысить эффективность эндоскопической диагностики рака мочевого пузыря. Тем не менее, индуцированные 5-алк эндогенные порфирины могут накапливаться не только в зоне малигнизации, но и в областях с доброкачественными изменениями, в частности, в зонах хронического воспаления, что приводит к появлению ложно положительной флуоресценции. Одной из причин накопления эндогенных порфиринов может быть присутствие локальной микрофлоры.

В нашей работе было проведено исследование возможности накопления эндогенных порфиринов несколькими штаммами бактерий, специфичных для мочевого пузыря. Исследование проводилось *in vitro* методами спектрофлуориметрии и лазерной сканирующей микроскопии. Проведена оценка спектров возбуждения и флуоресценции бактериальных суспензий при введении 5-алк и исследована динамика накопления флуоресцирующих соединений. Выявлено, что в ходе инкубации с 5-алк происходит перераспределение интенсивности флуоресценции между максимумами на длинах волн 630/673 нм, и на длинах волн 623 и 683, 750 нм. При этом накопление флуоресцирующих продуктов происходило внутри клеток, а не в суспензионной среде. Таким образом, присутствие бактериальной микрофлоры может снижать эффективность флуоресцентной диагностики и для повышения специфичности метода необходимо предварительно удалять микрофлору с помощью подходящих антисептических процедур.

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ЖЕЛЕЗА НА СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ ЭНДОГЕННЫХ ПОРФИРИНОВ

Ирина ВАСИЛЕВИЧ, Елена ЛОБАНОК, Сергей ПИНЧУК

ГНУ “Институт биофизика и клеточной инженерии НАН Беларуси”, Академическая 27, Минск, 220072, Беларусь
E-mail: irina-vasilevich@yandex.ru; FAX: +375-17-284-23-59

Результат фотодинамического воздействия (ФДВ) на клетки в значительной степени определяется наличием соединений, способных потенцировать развитие окислительных процессов. К ним, прежде всего, относятся ионы свободного восстановленного железа (Fe^{2+}), усиливающие перекисное окисление мембранных липидов.

Целью настоящей работы явилось исследование влияния ионов железа на фотосенсибилизируемое эндогенными порфиринами повреждение митохондрий клеток костного мозга (КМ) и лимфобластной линии Molt 4/8. Накопление в клетках фотодинамически активных пигментов индуцировали добавлением в культуральную среду их раннего предшественника – 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК), с последующей инкубацией в темноте в течение 1–4 ч. Состояние митохондрий оценивали по связыванию потенциалчувствительного зонда ($1,3 \cdot 10^{-6} M$) родамина 123 (Rh 123).

Установлено, что клетки КМ, инкубированные 4 ч с АЛК (0,8 мМ), накапливают такое же количество протопорфина IX (ПП), как лимфобласты линии Molt 4/8 за 1 ч. Освещение клеточных суспензий при внутриклеточном уровне ПП, составляющем 0,262 нмоль/108 клеток в дозе 44 кДж/м², приводит к увеличению связывания Rh 123 клетками КМ в 1,5 раза, лимфобластами в 2,1 раза. АЛК без освещения, а также освещение клеток, инкубированных без АЛК, не влияет на связывание Rh 123. Добавление в культуральную среду за 20 мин до окончания инкубации 25 мкМ $FeSO_4$ не изменяет образование ПП в обоих типах клеток и выраженность фотоповреждения митохондрий лимфобластов линии Molt 4/8. Однако ионы железа более чем в 1,2 раза увеличивают фотоиндуцированное связывание Rh 123 клетками КМ. Полученные данные свидетельствуют об избирательном эффекте ионов Fe^{2+} при ФДВ эндогенных порфиринов в нормальных и трансформированных клетках.

ВЛИЯНИЕ УФ-ОБЛУЧЕНИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ LFA-1 МОЛЕКУЛ Т-ЛИМФОЦИТАМИ КРОВИ ДОНОРОВ

С.М. ДУБОВА, В.Г. АРТЮХОВ, О.В. ПУТИНЦЕВА

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», 394006, Воронеж, Россия
E-mail: avg@main.vsu.ru; Fax: +7-4732-208-308

В современной медицине УФ-свет широко применяется для коррекции различных патологических состояний. Развитие нормального иммунного ответа невозможно без взаимодействия иммунокомпетентных клеток как между собой, так и с клетками организма, которое осуществляется посредством молекул адгезии на их поверхности. Одной из таких адгезивных молекул является интегрин LFA-1, представляющий собой трансмембранный гликопротеид, состоящий из двух субъединиц CD11a и CD18 и принимающий участие в активации любого Т-лимфоцита.

Нами было исследовано влияние УФ-света на уровень экспрессии молекул LFA-1 на поверхности мембран Т-лимфоцитов крови человека.

Выделение лимфоцитов из дефибринированной крови 15 доноров осуществляли по методу А. Boum. Разделение их на Т- и В-субпопуляции осуществляли по методу Р. Terasaki. Суспензию Т-клеток облучали с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 (240–390 нм) в течение 1, 3, 6 и 9 минут, что соответствовало дозам облучения 151, 453, 906 и 1359 Дж/м². Для определения уровня экспрессии LFA-1 молекул применяли метод твердофазного иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител к CD11a субъединице LFA-1 рецептора человека.

Уровень экспрессии LFA-1 антигенов на поверхности мембран нативных Т-лимфоцитов составлял в среднем $0,292 \pm 0,018$ отн. ед.

После воздействия на образцы Т-клеток УФ-света в дозах 151–906 Дж/м² не происходило статистически достоверных изменений уровня экспрессии изучаемых антигенов.

Наибольшая из использованных нами доз УФ-света (1359 Дж/м²) вызывала снижение ИФА-сигнала на 18,2 %, по сравнению с контрольными образцами клеток.

На основании вышеизложенного нами был сделан вывод о том, что только большая доза УФ-света (1359 Дж/м²) приводит к падению экспрессии исследуемых рецепторов, что может выражаться в торможении процессов формирования стабильных зон контакта между клетками при их взаимодействии.

С4.5

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОКСИГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА, МОДИФИЦИРОВАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЕМ ПРЕПАРАТОВ – ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА И УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ

Е.А. КАЛАЕВА, О.В. ПУТИНЦЕВА, В.Г. АРТЮХОВ

Воронежский государственный университет, Университетская пл., 1, г. Воронеж,
394006, Россия
E-mail: bf188@bio.vsu.ru; Тел/факс: +7-4732-208-308

Функционирование молекул оксида азота в клетках организма человека тесно связано с низкомолекулярными серосодержащими пептидами, и в частности, с восстановленным глутатионом (GSH), молекулы которого входят в состав антиоксидантной системы. Соединяясь с оксидом азота, GSH образует S-нитрозоглутатион (GSNO), который защищает NO от различных воздействий при внутри- и межклеточном переносе. GS-NO (10^{-5} , 10^{-4} и 10^{-3} моль/л) при воздействии на гемоглобин способствует образованию окисленных форм гемоглобина, количество которых возрастает с увеличением концентрации модификатора. Фракционный состав гембелка в присутствии GS-NO в концентрациях 10^{-4} и 10^{-3} моль/л сопровождается увеличением числа электрофоретических фракций гемопротеида с 4 до 5. Присутствие модификатора способствует процессам фотовосстановления окисленных форм гембелка и увеличению его кажущейся молекулярной массы.

Скрытые изменения в структуре молекул гемоглобина, происходящие под влиянием GS-NO, позволяют обнаружить эксперименты по воздействию на исследуемые образцы УФ-света в дозе 151 Дж/м^2 . Выявлены конформационные перестройки глобиновой части гемопротеида и изменения третичной и четвертичной структуры гембелка в присутствии GS-NO, связанные с ослаблением субъединичных контактов в молекуле гемопротеида, частичным разворачиванием полипептидных цепей, входящих в состав белковой глобулы, увеличением объёма и размера последних.

Выявлено, что УФ-облучение дозой 151 Дж/м^2 растворов гемоглобина, предварительно модифицированного GS-NO (10^{-3} моль/л), способствует процессам перехода атома железа гема из трехвалентного в двухвалентное состояние и фотопревращению исходной окисленной формы гембелка в низкоспиновую. Следовательно, процедура облучения малыми дозами УФ-света может использоваться для нивелирования отрицательных последствий воздействия низкомолекулярных тиолсодержащих соединений на гембелки.

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОГО ЦЕНТРА НЕКОТОРЫХ ГИДРОЛАЗ В ПРИСУТСТВИИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА – МЕТИЛЕНОВОГО ГОЛУБОГО

О.М. КОЖОКИНА¹, Т.А. КОВАЛЕВА², М.Г. ХОЛЯВКА²

¹ГОУ ВПО ВГМА им. Н.Н. Бурденко Росздрава

²ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», 394006, Воронеж, Россия
E-mail: Tamara_Kovaleva@inbox.ru; fax: +7-4732-208-308

Детальное изучение особенностей строения активного центра фермента - неперемная стадия изучения механизма его действия. Фотоокисление в присутствии сенсibilизатора метиленового голубого (МГ) позволяет выявить наличие в активном центре энзима аминокислотных остатков с ароматическими и серосодержащими боковыми радикалами.

Объектами исследования служили глюкоамилаза (ζ -1,4;1,6-глюкан-4,6-глюкогидролаза, КФ 3.2.1.3) из *Saccharomyces cerevisiae* ЛВ-7 и инулиназа (2,1- η -D-фруктанфруктаногидролаза, КФ 3.2.1.7) из *Aspergillus awamori* ВКМФ-2250. Для идентификации функциональных групп активных центров гидролаз нами были использованы следующие методы: 1) фотоокисление в присутствии МГ, 2) компьютерное моделирование с помощью программы MolScript на основе данных РСА (<http://www.rcsb.org>).

Обнаружено, что с повышением дозы УФ-облучения в диапазоне 1,5–6,0 кДж/м² наблюдается снижение каталитической активности как глюкоамилазы, так и инулиназы, усиливаемое в присутствии МГ. Выявлено, что с увеличением значения рН происходит возрастание величины константы скорости фотоинактивации (K_f) гидролаз. Отсутствие плато на кривой зависимости K_f от рН в диапазоне величин рН 6,0–7,0 свидетельствует о пассивном отношении остатка His в активном центре глюкоамилазы к каталитическому акту. Вероятно, фотоинактивация глюкоамилазы вызвана разрушением индольного кольца Trp, идущим с участием синглетного кислорода. Найденные графическим путем значения $pK_1=3,8-3,9$ для обоих ферментов соответствуют величине pK карбоксильных групп Asp и Glu. Рассчитанная для инулиназы величина $pK_2=6,7$ представляет собой, вероятно, константу ионизации имидазольного кольца His. Метод компьютерного моделирования позволил подтвердить наличие в активном центре глюкоамилазы 1Asp, 2Glu, а также 1Trp, выполняющего субстратсвязывающую функцию, фотоокисление которого в присутствии МГ мы, очевидно, наблюдаем.

С4.7

УСТОЙЧИВОСТЬ КЛЕТОК КРОВИ К ФОТОДИНАМИЧЕСКОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ КАК ВОЗМОЖНЫЙ КРИТЕРИЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Константин Владимирович ЛАЗНЕВ

Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск
220013, ул. П.Бровки, 3/3, Беларусь;
E-mail: kvlaznev@mail.ru

Исследовали возможность применения фотодинамического воздействия (ФДВ) с мембранотропным фотосенсибилизатором мероцианином-540 (МЦ540) как тестового окислительного воздействия для оценки эффективности антиоксидантной защиты (АОЗ) плазматической мембраны (ПМ) клеток крови: нейтрофилов (НФ) и эритроцитов (Э). Методы оценки АОЗ клеток крови по их ответу на ФДВ представляют интерес как возможная простая и требующая минимального количества биологического материала альтернатива широко применяемым методам оценки антиоксидантной активности плазмы крови в диагностике состояния окислительного стресса (ОС). Устойчивость Э к ФДВ оценивали по времени 50 % фотодинамически индуцированного гемолиза (ФДИГ), устойчивость НФ – по проценту лизиса фагоцитирующих дрожжи НФ, подвергнутых ФДВ. Чтобы доказать, что данные показатели отражают эффективность АОЗ ПМ, антиоксидантный статус клеток модифицировали перед ФДВ путем инкубации 1 ч в среде, содержащей 10^{-6} М ζ -токоферола (ζ -ТФ). При этом процент лизиса НФ и скорость ФДИГ достоверно ($p < 0,1$ и $p < 0,05$, соответственно) снижались – т.е. эти показатели характеризуют по крайней мере ζ -ТФ-зависимые системы АОЗ. Сравнение по данным показателям небольших (пилотных) групп людей и животных – контрольных и характеризующихся повышенной вероятностью ОС (пациенты с дыхательной недостаточностью, крысы после изнуряющего плавания, крысы с инфарктом миокарда) – не выявило достоверных различий между группами. В то же время обнаружены стабильные различия между индивидами, причем в группах риска ОС дисперсия выше, чем в контрольных. Обнаружена корреляция (коэффициент 0,76–0,86) между показателями ФДИГ и лизиса фагоцитирующих НФ после ФДВ. Это позволяет использовать один, более объективный показатель из двух (время 50 % ФДИГ) при разработке фотодинамического метода оценки АОЗ ПМ клеток крови. Работа выполнена при поддержке Белорусского Республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б06М-222).

**НЕЙРОТРОФИЧЕСКАЯ МОДУЛЯЦИЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО
ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕЙРОНОВ И ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК****Андрей ЛОБАНОВ, Анатолий УЗДЕНСКИЙ**

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, 344090, Россия;
E-mail: auzd@yandex.ru; Тел./Факс: 8632-433577

Как показано ранее, механорецепторные нейроны рака защищают сателлитные глиальные клетки от фотоиндуцированного апоптоза (Kolosoу, Lobanov, 2006). Возможно, их защитное действие обусловлено выделением нейротрофических факторов (НТФ), инициирующих в глиальных клетках противоапоптотические процессы. Мы изучили влияние ряда НТФ (NGF, BDNF, GDNF, CNTF), а также эпидермального фактора роста EGF на выживаемость нейронов и глиальных клеток, подвергнутых фотодинамическому (ФД) воздействию Фотосенса (10^{-7} М). Источником света служил диодный лазер (670 нм, 0,4 Вт/см²). Для визуализации ядер живых, некротических и апоптотических клеток препарат флуорохромировали Hoechst 33342 и иодидом пропидия. 30-минутное ФД воздействие вызывало торможение и прекращение нейронной активности, а через 8 часов наблюдалось достоверное повышение уровня некроза нейронов, а также некроза и апоптоза глии (в этих нейронах апоптоз не наблюдался). NGF (100 нг/мл) и GDNF (10 нг/мл) предотвращали ФД-индуцированное повышение уровня апоптоза глиальных клеток, но не влияли на импульсную активность и некроз нейронов. NGF также снижал некроз глии. BDNF (1 нг/мл), CNTG (50 нг/мл) и EGF (100 нг/мл) не влияли на некроз и апоптоз МРН и ГК в темноте или при ФД воздействии. Но, в отличие от других НТФ, CNTF достоверно замедлял фотоинактивацию нейронов. Вероятно, НТФ, аналогичные нейротрофинам млекопитающих, участвуют в нейроглиальных взаимодействиях в рецепторе растяжения речного рака, подвергающемуся ФД повреждению. Возможно, МРН выделяет НТФ, аналогичные NGF и GDNF, а глиальные клетки, но не нейроны, имеют рецепторы, способные распознать эти нейротрофины и защитить эти клетки от ФД-индуцированной смерти. Отсутствие влияния BDNF, CNTF и EGF на МРН и глиальные клетки речного рака в концентрациях, действующих на нейроны млекопитающих, говорит об отсутствии или меньшей чувствительности их рецепторов.

Работа поддержана грантами РФФИ 05-04-48440 и 08-04-01322.

С4.9

ВЛИЯНИЕ ГЛУТАТИОНА НА ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЕМЫЕ АЛК-ИНДУЦИРОВАННЫМИ ПОРФИРИНАМИ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК

Елена ЛОБАНОК, Наталия ШУКАНОВА, Ирина ВАСИЛЕВИЧ

ГНУ “Институт биофизика и клеточной инженерии НАН Беларуси”, Академическая 27, Минск, 220072, Беларусь;
E-mail: shukanova@biobel.bas-net.by; FAX: +375-17-284-23-59

При разработке методов фотодинамической терапии (ФДТ) большую актуальность приобретает изучение механизмов функционирования антиоксидантных систем клеток в условиях фотосенсибилизируемого эндогенными хромофорами воздействия. При этом важное значение в повышении эффективности ФДТ может иметь различие в балансе уровня восстановленного глутатиона (GSH) в здоровых и патологически измененных клетках.

Целью настоящей работы явилось исследование влияния экзогенного GSH на фотосенсибилизируемые эндогенными порфиринами повреждения плазматических мембран тимоцитов и лимфобластных клеток Molt 4/8. Накопление порфириновых пигментов в клетках индуцировали 5-аминолевулиновой кислотой (0,8 мМ) в течение 0,5–4 ч. Состояние мембран оценивали по интенсивности флуоресценции в клеточных суспензиях мембранотропного зонда (0,2 мкМ) мероцианина 540 (Мц 540), который обладает амфифильными свойствами, встраивается в жидкокристаллические области липидов и при определенных условиях регистрирует начальные стадии апоптоза. Установлено, что при одинаковом уровне порфиринов, мембраны лимфобластных клеток более устойчивы к фотоповреждениям. Даже при увеличении содержания в них протопорфирина в 3 раза, фотоиндуцируемые изменения интенсивности флуоресценции Мц 540 остаются в 2,3 раза меньше, чем в тимоцитах. Введение в клеточные суспензии за 10–60 мин перед освещением глутатиона в физиологических концентрациях (0,5 мМ) разнонаправленно влияет на состояние мембран исследуемых популяций клеток. В тимоцитах GSH снижает регистрируемые Мц 540 фотоповреждения плазматических мембран, в клетках Molt 4/8 наоборот усиливает их в 1,2 раза. Полученные результаты хорошо согласуются с увеличением в присутствии глутатиона жизнеспособности тимоцитов и ее снижением в клетках Molt 4/8 при фотосенсибилизируемом эндогенными порфинами воздействии.

С4.10

**ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫЕ МЕТИЛЕНОВЫМ ГОЛУБЫМ
МОДИФИКАЦИИ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ НЕКОТОРЫХ КЛЕТОК
КРОВИ И АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА В УСЛОВИЯХ
РАЗЛИЧНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ**

**Юлия ЛЫСЕНКО, Валерий АРТЮХОВ, Вера ВИРЮТИНА,
Татьяна ШВЫРЕВА**

Воронежский государственный университет, Воронеж, 394006, Россия;
E-mail: bf349@bio.vsu.ru; Fax: +7-4732-20-83-08

Для разработки способов тонкой регуляции процессов, протекающих в неопластических образованиях в ходе фотодинамического воздействия, необходимо выяснить направления модификации отдельных компонентов опухолевых клеток и их микроокружения в условиях варьирования концентрации экзогенного сенсibilизатора и дозы облучения. В связи с этим целью настоящей работы явилась детализация механизмов воздействия тиазинового красителя — метиленового голубого (МГ) — на некоторые физико-химические свойства белков — ферментов эритроцитов крови мышей (самцы аутбредных стокв SHK и NMRS), а также клеток и асцитной жидкости карциномы Эрлиха (АКЭ) в процессе облучения указанных образцов светом аппарата “УЛОКС” (665 нм). Выявлено ингибирующее действие красителя по отношению к уровню каталитической активности лактатдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы лизата клеток и асцитной жидкости АКЭ после облучения рассматриваемых систем красным светом в присутствии МГ (10^{-6} – 10^{-4} моль/л), сопровождающееся изменением изоэлектрического спектра белков и электрофоретической подвижности его отдельных фракций. Исследование уровня ферментативной активности аспартат (АсАТ) и аланинаминотрансферазы (АлАТ) эритроцитов крови мышей после облучения красным светом (6 Дж/см^2) суспензии клеток и их лизата позволило установить, что фотомодификация образцов в отсутствие МГ способствует разнонаправленным изменениям каталитической активности анализируемых белков: инактивации АсАТ и активации АлАТ. Добавление при облучении в исследуемую систему красителя сопровождается увеличением активности ферментов по сравнению с таковой нативных образцов. Полученные результаты свидетельствуют о способности метиленового голубого оказывать модулирующее действие на активность некоторых ключевых ферментов клеточного метаболизма в условиях облучения, что может быть использовано при разработке методов направленной регуляции процессов, протекающих в ходе фототерапии некоторых заболеваний.

C4.11

**ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ ИОННЫХ
КАНАЛОВ ГРАМИЦИДИНА А В БИСЛОЙНОЙ ЛИПИДНОЙ
МЕМБРАНЕ В ПРИСУТСТВИИ КАТИОННЫХ
МЕТАЛЛОФТАЛОЦИАНИНОВ: РОЛЬ СВЯЗЫВАНИЯ
ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА С МЕМБРАНОЙ**

**Алина ПАШКОВСКАЯ¹, Елена КОТОВА¹, Владимир МАЙЗЛИШ²,
Юрий АНТОНЕНКО¹**

¹НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского

МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

E-mail: PashkovskaiaAA@yandex.ru; Fax: +74959393181

²Ивановский государственный химико-технологический университет, Иваново

Положительно заряженные фотосенсибилизаторы являются наиболее эффективными фотодинамическими агентами, вызывающими фотоинактивацию как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Предполагается, что причиной этого является электростатическое взаимодействие катионных фотосенсибилизаторов с отрицательно заряженной поверхностью клеточной оболочки бактерий. Ранее для оценки эффективности фотосенсибилизаторов в нашей лаборатории был разработан метод регистрации фотоповреждения каналообразующего пептида грамицидина А, основанный на измерении падения индуцированного грамицидином тока через модельную бислойную липидную мембрану (БЛМ) в ответ на освещение видимым светом в присутствии фотосенсибилизатора. В настоящей работе с помощью этого метода было проведено сравнительное изучение фотосенсибилизирующей активности тетра(трибутил аммонийметил)гидрокси-фталоцианина алюминия (AlPcN₄), метиленового синего и тетрасульфированных фталоцианинов алюминия, цинка и никеля, имеющих, соответственно, четыре положительных, один положительный и четыре отрицательных заряда. На отрицательно заряженной мембране AlPcN₄ обладал наибольшей фотодинамической активностью по сравнению с остальными фотосенсибилизаторами, что согласуется с данными по электрофоретической подвижности липосом, где показано, что AlPcN₄ наиболее эффективно из изученного ряда фотосенсибилизаторов связывается с липосомами, образованными из смеси липидов *E. coli*. Сравнение эффективности фотодинамического действия изученных фотосенсибилизаторов на ионные каналы грамицидина в нейтральной и отрицательно заряженной БЛМ выявило существенную роль электростатических факторов во взаимодействии заряженных фотосенсибилизаторов с мембраной.

**ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЕМОЕ ПОРФИРИНАМИ
ПОДАВЛЕНИЕ ПРОРАСТАНИЯ ГРИБНЫХ СПОР****Сергей ПИНЧУК, Александр ВОРОБЕЙ**

ГНУ “Институт биофизика и клеточной инженерии НАН Беларуси”,
Академическая 27, Минск, 220072, Беларусь
E-mail: shukanova@biobel.bas-net.by; FAX: +375-17-284-23-59

Способность микопатогенов сельскохозяйственных культур к быстрой адаптации к действию протравителей с появлением устойчивых к фунгицидам штаммов остро ставит задачу поиска новых эффективных подходов в борьбе с патологической микрофлорой семян. Одним из перспективных подходов является использование фотодинамического воздействия для подавления прорастания грибных спор. Нами изучено влияние фотосенсибилизируемого гидрофобным протопорфирином IX (ПП) и имеющим положительно заряженные группы 5,10,15,20-мезо-тетра(4-N-метилпиридил)порфином (ТМПП) воздействия на прорастание спор *Fusarium culmorum* в питательной среде.

Споры грибов *F. culmorum* выделяли из пораженных зерновок ярового ячменя. Перед освещением споры гидратировали ($5 \cdot 10^5$ спор/мл) в 0,05 М натрий-фосфатном буфере (рН 7,4) в течение 2 часов и инкубировали 30 мин в присутствии $4 \cdot 10^{-6}$ М порфиринов. Суспензии спор освещали светом слайд-проектора в дозе 70–200 кДж/м² при интенсивности светового потока 150 Вт/м². Для прорастания конидии переводили в среду Чапека и выдерживали при 25°С в течение 20 часов. Прорастание конидий характеризовали процентом спор, имеющих ростовые трубки.

Выдерживание неосвещенных конидий в среде Чапека в течение 20 часов приводит к появлению ростовых трубок у ~80% спор. В суспензиях спор, освещенных в дозе 200 кДж/м² в присутствии ПП, количество проросших конидий составляет 52 %, а освещенных в дозе 70 кДж/м² в присутствии ТМПП – лишь 4 %. Освещение суспензий спор без порфиринов, а также сами порфирины в используемых концентрациях не оказывают заметного влияния на прорастание конидий. Таким образом, освещение суспензий спор *F. culmorum* в присутствии порфиринов подавляет их прорастание в питательной среде. Установлено, что имеющий положительный заряд ТМПП более эффективный фотосенсибилизатор инактивации конидий *F. culmorum* по сравнению с гидрофобным ПП вследствие его повышенного связывания со спорами.

C4.13

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ CD8 РЕЦЕПТОРОВ НА ПОВЕРХНОСТИ Т-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, ИНДУЦИРОВАННОЙ УФ-ИЗЛУЧЕНИЕМ

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

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», 394006, Воронеж, Россия;
E-mail: avg@main.vsu.ru; FAX: +7-4732-208-308

Известно, что УФ-свет оказывает стимулирующее действие на функциональную активность иммунокомпетентных клеток. Ранее нами было установлено, что под действием УФ-излучения происходит повышение уровня экспрессии CD4 маркеров на мембранах субпопуляции Т-хелперов. Определенный интерес представляет изучение влияния УФ-света на цитотоксические Т-лимфоциты, в частности, на экспрессию их основных маркеров – CD8 рецепторов. Данные рецепторы являются одними из основных корецепторных молекул Т-клеточного рецептора (TCR), определяют специфику распознавания антигена Т-киллерами и повышают сродство TCR к комплексу МНС класса I-антигенный пептид при взаимодействии Т-лимфоцитов и антигенпрезентирующих клеток.

Лимфоциты выделяли из гепаринизированной крови 15 доноров методом седиментации на градиенте плотности фиколл-урографина ($1,077 \text{ г/см}^3$) и разделяли на Т- и В- субпопуляции по методу Terasaki. Облучение суспензий Т-клеток проводили светом ртутно-кварцевой лампы ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240–390 нм в дозах 151, 453, 906, 1359 Дж/м². Уровень экспрессии CD8 антигенов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. Результаты экспериментов регистрировали спектрофотометрически на ИФА-анализаторе «Униплан» при длине волны 450 нм и выражали в единицах оптической плотности (отн. ед).

Уровень экспрессии CD8 маркеров на поверхности мембран нативных Т-клеток в среднем составил $0,202 \pm 0,011$ отн. ед. Было выявлено, что все используемые нами дозы УФ-света (151–1359 Дж/м²) приводят к увеличению уровня ИФА-сигнала от 23 до 56 % по сравнению с контролем. Таким образом, УФ-свет (151–1359 Дж/м²) оказывает иммуностимулирующее действие на CD8⁺ Т-лимфоциты, что будет способствовать усилению их цитотоксического или супрессорного эффектов, что важно учитывать при иммунокорректирующей терапии.

ПРОТИВОАПОПТОЗНОЕ ДЕЙСТВИЕ ГЛУТАМАТА ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Наталья РОМАНЕНКО, Анатолий УЗДЕНСКИЙ

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, 344090, Россия
E-mail: auzd@yandex.ru; Тел/Факс: 8632-433577

Межклеточные взаимодействия регулируют состояние и выживаемость клеток при повреждающих воздействиях. В тканях они реализуются путем адгезионных контактов клеток и обмена сигнальными молекулами, которые распознаются соответствующими рецепторами и иницируют внутриклеточные сигнальные каскады. Молекулярными сигналами в нервной ткани служат нейротрофические факторы и нейромедиаторы. Мы изучали возможное участие нейромедиатора глутамата в нейроглиальных взаимодействиях в рецепторе растяжения рака, подвергнутом фотодинамическому воздействию. Этот модельный объект состоит всего из двух нейронов, окруженных глиальными клетками (ГК). Их апоптоз выявляли с помощью флуорохрома Hoechst 33342, а некроз – пропидиум-йодида. Фотосенсибилизатором служил алюмофталочинин Фотосенс, а источником света – диодный лазер (670 нм, 0,4 Вт/см²). Фотодинамическое воздействие вызывало инактивацию нейронов, их некроз, а также некроз и апоптоз ГК. Глутамат (10 мкМ), его агонист NMDA (1 мМ), ингибитор NMDA-рецептора МК-801 (5 мкМ), ингибитор метаботропных NMDA рецепторов AP-3 (10 мкМ) и N-ацетиласпартатглутамат (NAAG, 10 мкМ) не влияли на нейронную активность в темноте в течение примерно 3 часов. Все они, кроме NAAG, не влияли на фотоиндуцированную импульсную реакцию и некроз нейронов и ГК. Однако, глутамат снижал уровень фотоиндуцированного апоптоза глии. NAAG, который в межклеточной жидкости гидролизуетсся с высвобождением глутамата, также снижал апоптоз ГК. В действии глутамата не участвовали NMDA рецепторы, т.к. ни сам NMDA, ни его ингибитор МК-801 не влияли на фотоиндуцированный апоптоз глии. Неожиданно, ингибирование метаботропных рецепторов глутамата не усиливало, а тоже предотвращало апоптоз глии. Таким образом, глутамат, выделяющийся из нейронов, может служить посредником в нейроглиальных взаимодействиях и оказывать противоапоптотное действие на выживаемость фотоповрежденных глиальных клеток. В реализации его действия, вероятно, участвуют рецепторы, отличные от NMDA или метаботропных рецепторов.

Работа поддержана грантами РФФИ 05-04-48440 и 08-04-01322.

C4.15

**ДИНАМИКА УЛЬТРАСТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ
В МЕХАНОРЕЦЕПТОРНОМ НЕЙРОНЕ РАКА, ВЫЗВАННЫХ
ФОТОДИНАМИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ**

Григорий ФЕДОРЕНКО^{1,2}, Анатолий УЗДЕНСКИЙ¹

¹Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, 344090, Россия

E-mail: auzd@yandex.ru; Тел./Факс: 8632-433577

²Южный научный центр РАН, Ростов-на-Дону, Россия

Фотодинамическое воздействие интенсивно производит синглетный кислород и другие активные формы кислорода, вызывающие окислительный стресс и смерть клеток. Для изучения механизма фотодинамического повреждения нервных клеток, мы исследовали динамику ультраструктурных изменений в изолированных механорецепторных нейронах рака, сенсibilизированных сульфированным алумофталоцианином Фотосенсом и облученных диодным лазером (670 нм, 0,4 Вт/см²). 5-минутное воздействие вызывало начальные изменения импульсной активности нейронов. При этом только в отдельных митохондриях наблюдалось повреждение мембран и локальное просветление матрикса. К компенсаторным изменениям можно отнести некоторую деконденсацию ядерного хроматина, удлинение и агрегацию митохондрий, формирование лизосом и появление аутофагосом. Более длительное, 30-минутное фотодинамическое воздействие вызывало торможение и необратимое прекращение импульсной активности нейрона, разрушение аппарата Гольджи и многих, но не всех митохондрий, исчезновение полисом, участвующих в синтезе белка, и гликогеновых гранул, служащих источниками энергии, набухание цистерн эндоплазматического ретикулума, появление многочисленных лизосом и аутофагосом. Интересно, что в иногда разрушалась только часть митохондрии, а другая половина имела нормальную структуру без признаков набухания. Через 1 час после воздействия наблюдалась картина, характерная для некротической клетки, с набуханием и разрушением крист практически всех митохондрий, набуханием цистерн эндоплазматического ретикулума и появлением многочисленных вакуолей. Таким образом, митохондрии и аппарат Гольджи были наиболее чувствительны к фотодинамическому воздействию Фотосенса. По мере воздействия повреждения захватывали и другие структуры и генерализовались на всю клетку, приводя к некрозу.

Работа поддержана грантами РФФИ 05-04-48440, 05-04-96754 и 08-04-01322.

C4.16

**ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ДРОЖЖЕВЫХ
КЛЕТОК С УЧАСТИЕМ ЭНДОГЕННЫХ И ЭКЗОГЕННЫХ
СЕНСИБИЛИЗАТОРОВ**

**Анна ШУМАРИНА, Наталья БЕЛЕНИКИНА,
Марина СТРАХОВСКАЯ, Григорий ФРАЙКИН**

Биологический факультет МГУ, кафедра биофизики; Ленинские горы, д.12, корп.1,
Москва, 119992, Россия
E-mail: shum_a@mail.ru; Fax: 939-11-15

Клетки дрожжей инактивируются видимым светом, спектр действия фотоинактивации совпадает со спектром поглощения хромофоров порфиринового типа. Использование предшественника синтеза порфиринов аминолевулиновой кислоты и/или хелатора 2,2'-дипиридила приводит к значительному увеличению содержания в клетках протопорфинаIX и фоточувствительности дрожжей. Флуоресцентные характеристики эндогенного протопорфинаIX (наличие двух максимумов флуоресценции при 625 и 635 нм) и особенности фотовыцветания его флуоресценции позволяют предполагать наличие в клетках двух фракций протопорфинаIX – связанной с белками и растворенной в липидной фазе мембран. Увеличение содержания протопорфинаIX в плазматических мембранах и митохондриях дрожжей сопровождается структурными и функциональными нарушениями этих органелл при действии видимого света – повышением проницаемости мембран и ингибированием дыхания. Повышенная по отношению к дикому штамму фоточувствительность мутантов дрожжей по пострепликативной репарации свидетельствует о возникновении фотоповреждений ядерной ДНК. Таким образом, инактивация колониеобразующей способности дрожжей с индуцированным синтезом протопорфинаIX может быть следствием взаимодействия поврежденных разных структур и органелл клетки. При фотоинактивации дрожжей экзогенными сенсibilизаторами хлоринового типа повреждения происходят преимущественно в плазматической мембране, образование везикул которой выявляется методом электронной микроскопии.

Секция 5:

Флуоресцентные белки, биолюминесценция

Тезисы докладов

**ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ КАК НОВЫЙ ОБЪЕКТ
ФОТОБИОЛОГИИ****Сергей ЛУКЬЯНОВ**

Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН, Миклухо-Маклая 16/10, 117997 Москва, Россия;
E-mail: luk@ibch.ru; FAX: +7-495-330-70-56

Зеленый флуоресцентный белок (Green Fluorescent Protein, GFP) был обнаружен в медузе *Aequorea victoria* в 1962 г, но широкую известность он получил только в 90-х годах после клонирования соответствующего гена и демонстрации того, что этот ген может быть успешно экспрессирован практически в любом организме с образованием флуоресцентного белка, благодаря уникальной способности GFP формировать хромофорную группу самостоятельно, без участия каких-либо внешних ферментов и кофакторов, за исключением молекулярного кислорода. Широкие перспективы использования GFP в качестве полностью генетически кодируемой флуоресцентной метки дали импульс исследованию структуры, биохимических и биофизических свойств этого белка. Кроме того, методами направленного и случайного мутагенеза были получены различные спектральные варианты GFP, пик эмиссии флуоресценции которых приходится на синюю, голубую или желто-зеленую области видимого спектра. В 1999 году мы обнаружили GFP-подобные белки в неблюминесцентных представителях коралловых полипов класса Anthozoa, в том числе неизвестные ранее природные желтые и красные флуоресцентные белки, а также особую группу гомологов GFP - нефлуоресцентные хромобелки. Позднее, зеленые флуоресцентные белки были найдены в некоторых видах рачков Copepoda (тип Членистоногие), а в 2007 году даже в низших представителях типа Хордовые – ланцетниках. Эти открытия существенно расширили наши представления о функциональном, спектральном и филогенетическом разнообразии белков семейства GFP.

В данном докладе будут рассмотрены природное распространение, спектральные и структурные особенности GFP-подобных белков, а также области их практического применения. Особое внимание будет уделено мутантным вариантам, полученным в нашей лаборатории и обладающим уникальными характеристиками, не встречающимися среди природных белков: дальне-красной флуоресценцией, фотоактивируемой флуоресценцией, повышенной фототоксичностью и др.

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ЦВЕТА БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ ЛЮЦИФЕРАЗ СВЕТЛЯКОВ**Наталья УГАРОВА**

Химический факультет Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, Москва, 119991, Россия

Люцифераза светляков катализирует окисление органического субстрата – люциферина – в присутствии MgАТР. Продукт реакции – электронно-возбужденный оксилюциферин – при переходе в основное состояние излучает квант видимого света. Для нативных и мутантных люцифераз $\lambda_{\text{макс}}$ в спектре биолюминесценции варьируется от 540 до 620 нм в зависимости от структуры белка и внешних условий (рН, температура). Кроме того, спектры биолюминесценции во многих случаях имеют несимметричную форму, характерную для спектров, которые представляют собой суперпозицию спектров люминесценции нескольких эмиттеров. В литературе предложено несколько моделей для объяснения различий в спектрах биолюминесценции для нативных и мутантных люцифераз светляков и рН-зависимости этих спектров. В данном докладе мы рассматриваем эти модели с единой точки зрения как механизм влияния белкового микроокружения эмиттера на форму и $\lambda_{\text{макс}}$ биолюминесценции. Известно, что оксилюциферин может быть в трех формах: кетон ($\lambda_{\text{макс}} = \sim 620$ нм), енол ($\lambda_{\text{макс}} = \sim 580$ нм) и енолят-ион ($\lambda_{\text{макс}} = \sim 540$ нм) – в зависимости от рН и физико-химических свойств микроокружения эмиттера. С другой стороны, молекула люциферазы в растворе существует в виде равновесной смеси нескольких конформеров, у которых физико-химические свойства микроокружения эмиттера (жесткость, поляризуемость, микро-рН) несколько различаются. Структура конформера в микроокружении возбужденной молекулы оксилюциферина контролирует энергию и структуру эмиттера в комплексе фермент-оксилюциферин. Чем жестче структура белка в микроокружении, тем выше энергия эмиттера и тем ниже $\lambda_{\text{макс}}$ биолюминесценции. Следствием этого является «зеленый» цвет биолюминесценции, характерный для енолят-иона. При уменьшении рН для многих люцифераз увеличивается доля конформеров с более подвижной структурой, следовательно, увеличивается и доля излучения с меньшей энергией, что проявляется в виде «красной» составляющей в спектре биолюминесценции.

Работа финансируется РФФИ (Грант 08-04-00624).

ФОТОАКТИВИРУЕМЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ**Константин ЛУКЬЯНОВ**

Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН, Миклухо-Маклая 16/10, 117997 Москва, Россия
E-mail: kluk@ibch.ru; FAX: +7-495-330-70-56

Белки семейства зеленого флуоресцентного белка (Green fluorescent protein, GFP) находят широкое применение в качестве генетически кодируемых флуоресцентных меток для живых объектов. В последние несколько лет была охарактеризована группа природных и искусственно полученных мутантных белков, способных к фотоактивации – многократному возрастанию яркости флуоресценции в ответ на облучение светом определенной длины волны и интенсивности. В нашей лаборатории была создана панель фотоактивируемых флуоресцентных белков с различным типом свето-индуцируемых спектральных переходов: нефлуоресцентный красный (KFP1), голубой зеленый (PS-CFP) и зеленый красный (Dendra). Продемонстрирована применимость KFP1, PS-CFP и Dendra для прицельного фотомечения клеток, внутриклеточных органелл и белков и последующего слежения за их перемещениями, а также для мониторинга деградации целевых белков на уровне отдельных клеток в реальном времени с помощью флуоресцентной и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Ведется дальнейшая работа по получению новых фотоактивируемых флуоресцентных белков и изучению различных типов фотоконверсии флуоресцентных белков.

Д5.4

ФЕМТОСЕКУНДНАЯ КИНЕТИКА ПЕРВИЧНЫХ ФОТОПРОЦЕССОВ В РАЗГОРАЮЩЕМСЯ БЕЛКЕ КФР

**Александр П. САВИЦКИЙ^{1,4}, Олег М. САРКИСОВ²,
Александр В. НЕМУХИН^{3,4}, Белла Л. ГРИГОРЕНКО^{3,4}, Ксения БРАВАЯ⁴,
Иван ШЕЛАЕВ², Александр РУСАНОВ^{1,4}**

¹Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, Ленинский проспект, 33, Москва, 119071, Россия

E-mail: apsavitsky@inbi.ras.ru; Тел: +7-495-954-87-25

²Институт химической физики РАН

³Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, улица Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

⁴Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/3, Москва, 119992, Россия

Разгорающиеся белки типа КФР имеют большой потенциал применения в современной флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения. Изучение кинетики фемтосекундных спектров белка КФР выявило существование нескольких спектральных форм хромофора с характеристическими временами 80 фс и 400 фс. На основе квантовохимических расчетов хромофора в белковом окружении была проведена идентификация спектральных форм.

Д5.5

МЕХАНИЗМ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ Ca^{2+} -РЕГУЛИРУЕМЫХ ФОТОПРОТЕИНОВ

Евгений ВЫСОЦКИЙ^{1,2}, John LEE²

¹Институт биофизики СО РАН, Красноярск, 660036, Россия

E-mail: eugene_vysotski@ibp.ru; FAX: +7-3912-43-34-00

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Georgia, Athens, 30602, USA

Особое место среди многообразия биолюминесцентных систем занимают системы, названные «предварительно заряженными». Наиболее известными и изученными представителями таковых являются Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины, ответственные за свечение морских кишечнорастных животных [1]. Молекула фотопротеина представляет собой стабильный фермент-субстратный комплекс, состоящий из односубъединичного полипептида и «преактивированного» кислородом субстрата, 2-гидропероксицелентеразина, прочно, но нековалентно связанного с белком. Предлагаемый механизм биолюминесценции основан на пространственных структурах фотопротеинов в различных лиганд-зависимых конформационных состояниях. До связывания ионов кальция нестабильный 2-гидропероксицелентеразин, расположенный во внутренней полости белка, стабилизируется системой водородных связей. Связывание ионов кальция дестабилизирует водородные связи и инициирует тем самым реакцию декарбоксилирования, приводящую к образованию продукта реакции, целентерамида, в возбужденном состоянии. В структуре обелина, связанного с продуктом реакции, около амидного азота целентерамида обнаружена молекула воды, которая может отдавать протон диоксиэтанон аниону еще до образования целентерамида в возбужденном состоянии. Таким образом, первичным возбужденным продуктом биолюминесцентной реакции фотопротеинов должен быть возбужденный целентерамид в нейтральной форме, излучающий при 410 нм. Излучение при данной длине волны наблюдается у ряда мутантов фотопротеинов и в виде плеча в спектре некоторых фотопротеинов дикого типа. Более длинноволновое излучение (460-495 нм) возникает в результате переноса протона с ОН-группы целентерамида, находящегося в возбужденном состоянии, на расположенный поблизости (2.74 Å) остаток His [2].

[1]. Высоккий Е.С., Маркова С.В., Франк Л.А. *Молекулярная биология* 2006. Т.40, №3, С. 404–417.

[2]. Vysotski E.S., Lee J. *Acc. Chem. Res.* 2004. V. 37. P. 405–415.

**МНОГООБРАЗИЕ ЦЕЛЕНТЕРАЗИН-ЗАВИСИМЫХ
БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ****Светлана МАРКОВА, Людмила БУРАКОВА, Евгений ВЫСОЦКИЙ**Институт Биофизики СО РАН, Академгородок 50, Красноярск, 660036, Россия
E-mail: svetlana@ibp.ru; FAX: +7-3912-43-34-00

Целентеразин (и его производные) является самым распространенным субстратом в биолюминесцентных реакциях морских организмов, преобладающих среди светящихся организмов нашей биосферы. Несмотря на единый субстрат, другие компоненты данных биолюминесцентных реакций, а также их схемы в различных таксонах светящихся организмов отличаются поразительным разнообразием. Известные на сегодняшний день целентеразин-зависимые биолюминесцентные белки подразделяются на целентеразин-зависимые люциферазы и Ca^{2+} -зависимые фотопротеины; в отдельную группу следует выделить Ca^{2+} -зависимый целентеразин-связывающий белок из коралла *Renilla* как субстрат-связывающий белок.

Ca^{2+} -зависимые фотопротеины гидроидов и ктенофор при незначительной гомологии первичных последовательностей имеют практически одинаковые пространственные структуры, в том числе и с Ca^{2+} -зависимым целентеразин-связывающим белком из *Renilla*. В отличие от них, целентеразин-зависимые люциферазы различных групп морских организмов кардинально отличаются по первичным последовательностям, в том числе и по размеру – от наименьшей *MLuc7* (152 а/к остатка, 16.5 kDa), клонированной нами из копепода *Metridia longa*, до люциферазы длиной в 535 а/к остатков (~60 kDa) из остракоды *Cypridina*. Для некоторых из люцифераз установлена существенная гомология с различными клеточными белками, но не между собой. Такое разнообразие биолюминесцентных белков подразумевает независимое возникновение биолюминесцентной функции в различных таксонах из различных ранее существовавших клеточных биохимических реакций. Таким образом, следует ожидать дальнейшего открытия новых целентеразин-зависимых биолюминесцентных белков из неисследованных светящихся организмов.

Практическое применение целентеразин-зависимых биолюминесцентных белков как репортеров для мониторинга клеточных процессов обсуждается.

Д5.7

МУТАНТНЫЕ ФОРМЫ ЛЮЦИФЕРАЗЫ СВЕТЛЯКОВ С ПОНИЖЕННОЙ рН-ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ СПЕКТРОВ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Михаил КОКШАРОВ, Наталья УГАРОВА

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия
E-mail: mkoksharov@enz.chem.msu.ru

Люцифераза светляков (КФ 1.13.12.7) катализирует реакцию окисления люциферина кислородом воздуха в присутствии АТФ и Mg^{2+} , сопровождающуюся излучением света. Благодаря высокой каталитической активности и специфичности к АТФ, простоте регистрации биолюминесцентного сигнала люцифераза светляков широко применяется для определения АТФ и в качестве гена-маркера при изучении различных биохимических процессов.

Особенностью большинства нативных люцифераз светляков является сильная рН-зависимость спектра биолюминесценции. В частности, у изучаемой нами люциферазы светляков *Luciola mingrelica* при понижении рН из щелочной (рН>7,8) в кислую область (рН<6,0) цвет биолюминесценции изменяется с желто-зеленого ($\zeta_{max}=566$ нм) на красный ($\zeta_{max}=618$ нм) [1]. Несмотря на многочисленные исследования различных люцифераз жуков, причины и механизм этого процесса до сих пор являются предметом обсуждения.

С помощью случайного мутагенеза первых 225 из 548 аминокислотных остатков люциферазы светляков *Luciola mingrelica* были получены четыре мутантных фермента с пониженной чувствительностью спектра биолюминесценции к рН. Показано, что в результате замены F16L зависимость спектра биолюминесценции от рН заметно уменьшилась, а замены Y35N, Y35H и F16L/A40S привели к люциферазам, спектры биолюминесценции которых практически не изменяются в интервале рН 7,8-6,0 ($\zeta_{max}=564$ нм). Данные по кристаллической структуре гомологичной люциферазы светляков *Luciola cruciata* [2] позволяют предложить возможное объяснение эффекта замены Tug35, приводящей к практически рН-нечувствительному спектру биолюминесценции.

Работа финансируется РФФИ (Грант 08-04-00624).

1. Угарова Н.Н, Малошенок Л.Г., Упоров И.В., Кокшаров М.И.// Биохимия. 2005. Т. 70. С. 1262–1267.

2. Nakatsu, T., Ichijima, S., Hiratake, J., Saldanha, A., Kobashi, N., Sakata, K., and Kato, H.// Nature. 2006. V. 440. P. 372–376.

**МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРОЕНИЯ, СПЕКТРОВ И СВОЙСТВ
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ И ФОТОРЕЦЕПТОРНЫХ БЕЛКОВ**

**Александр НЕМУХИН^{1,2}, Белла ГРИГОРЕНКО¹, Игорь ПОЛЯКОВ¹,
Ксения БРАВАЯ¹, Анастасия БОЧЕНКОВА¹, Александр САВИЦКИЙ³**

¹Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/3, Москва, 119992, Россия
E-mail: anemukhin@yahoo.com; Тел: +7-495-939-10-96

²Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, улица Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

³Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, Ленинский проспект, 33, Москва, 119071, Россия

Для моделирования строения и оптических спектров флуоресцентных и фоторецепторных белков применяются современные методы молекулярного моделирования, включая комбинированные методы квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ). Согласно данному подходу расчет энергий в квантовой подсистеме проводится по компьютерным программам квантовой химии, а в молекулярно-механической подсистеме – с использованием силовых полей. Подразделение системы на КМ- и ММ-части производится на основании анализа доступных трехмерных моделей белков, в частности, содержащихся в базе данных белковых структур (PDB). Для расчетов свойств флуоресцентных и фоторецепторных белков к КМ-подсистеме относится хромофорная группа и ближайшие к ней аминокислотные остатки.

В докладе подробно обсуждаются результаты моделирования строения и спектров мутантов цветного белка asCP, для которого известны несколько структур в базе данных PDB. Равновесные геометрические конфигурации для модельных белковых систем определены по минимуму полной энергии в приближении КМ/ММ для транс- и цис-конформаций хромофорной группы с учетом её различных протонированных состояний. К квантовой подсистеме также относились аминокислотные остатки Arg92, Ser158, His197, Glu215. Для найденных стационарных точек проводились расчеты вертикальных энергий возбуждения, отвечающих переходам S_0-S_1 и S_0-S_2 . С этой целью использовались многоконfigurационные приближения квантовой химии, позволяющие обеспечить достаточно высокую точность вычислений. Рассчитанные положения полос в спектрах поглощения сопоставляются с экспериментальными данными. Сканирование фрагментов поверхностей потенциальной энергии возбужденных электронных состояний позволяет сформулировать гипотезы о механизме разгара флуоресцирующего варианта белка asFP595.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 07-03-00059.

Д5.9

КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ КАЛЬЦИЙ-РАЗРЯЖЕННОГО ОБЕЛИНА

**Ф.Н. ТОМИЛИН^{1,3}, Л.Ю. АНТИПИНА¹, Е.С. ВЫСОЦКИЙ²,
С.Г. ОВЧИННИКОВ^{1,3}**

¹Институт физики им. Л.В. Киренского СО РАН, 660036, Красноярск, Россия
E-mail: felixnt@gmail.com; факс: +7-3912-43-89-23

²Институт биофизики СО РАН, 660036, Красноярск, Россия

³Сибирский Федеральный Университет, 660041, Красноярск, Россия

Ca^{2+} -регулируемые фотопротеин обелин определяет свечение морского гидроида *Obelia longissima*. Фотопротеин представляет собой стабильный фермент-субстратный комплекс, состоящий из односубъединичного полипептида и «преактивированного» кислородом субстрата, 2-гидропероксицелентеразина, прочно, но нековалентно связанного с белком. БиOLUMИнесценция инициируется кальцием и возникает вследствие окислительного декарбокислирования связанного с белком субстрата. В результате образуются продукт реакции, целентерамид, в возбужденном состоянии и CO_2 . Переход целентерамида из возбужденного состояния в основное сопровождается излучением света. Недавно определены пространственные структуры нескольких лиганд-зависимых конформационных состояний обелина. Молекула фотопротеина представляет собой компактную глобулярную структуру, в центре которой в изолированной от растворителя полости расположена молекула 2-гидропероксицелентеразина. Однако пространственная структура обеспечивает информацию только о статическом состоянии молекулы. Какие изменения происходят непосредственно в ходе реакции, какие образуются интермедиаты, какова структура эмиттера, остается неизвестным. Восполнить этот пробел позволяют современные квантово-химические методы расчетов. В данной работе с помощью квантово-химические методов исследован молекулярный механизм флуоресценции Ca^{2+} -разряженного фотопротеина обелина. Согласно квантово-химическим вычислениям, выполненных для различных ионных форм целентерамида с учетом аминокислот активного центра, на роль эмиттера может претендовать только ион-парное состояние фенолят аниона целентерамида. Показано, что спектр флуоресценции этого состояния сильно зависит от положения протона между атомом кислорода фенольной группы целентерамида и атомом азота His22. Совпадение рассчитанных спектров поглощения и флуоресценции с наблюдающимися в эксперименте показывает адекватность квантово-химических вычислений и сделанных заключений.

Работа выполнена при поддержке РФФИ грант №07-04-00930-а

ENERGY CONVERSION IN BIOLUMINESCENT REACTIONS**KUDRYASHEVA N.S., NEMTSEVA E.V., BELOGUROVA N.V.**

Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, 660036, Russia,
Siberian Federal University, 660041, Krasnoyarsk, Russia
E-mail: kudr@ibp.ru

Bioluminescence phenomenon is based on enzymatic reactions transforming chemical energy to visible light with high quantum efficiency (1–100 %). There exist several types of bioluminescent reactions corresponding to several types of luminous organisms; they differ in chemical structure of components and enzymes. Purpose of the work was to reveal general similarities and peculiarities of energy conversion in different types of bioluminescent reactions – marine bacteria, coelenteramides, and fireflies. Variation of color of bioluminescence due to energy conversion is a question of a special interest in this study. Among similarities of the bioluminescent reactions are: (1) oxidative type of the reactions (with molecular oxygen included) and (2) type of electronic structure of the emitting molecules: emitters of $\phi\phi^*$ -type and upper electron-excited states of $n\phi^*$ -type. The type of electronic structure of the emitters suggests activity of the upper states, which can be formed as primary excited states in the oxidative bioluminescent reactions. The hypothesis on activity of the upper electron-excited states in bioluminescent process was experimentally verified using fluorescent molecules as energy acceptors. The hypothesis was confirmed experimentally in bacterial and coelenterate bioluminescence. However, activity of the upper electron-excited states was not found in firefly bioluminescence, probably because of highest efficiency of intramolecular energy transfer in the firefly emitter. The upper excited states can be responsible for blue shifts of the bioluminescence in the presence of proper fluorescent acceptors. Examples of red shifts of the bioluminescence due to Forster energy transfer are discussed. Another mechanism for variation of bioluminescence color takes place in coelenterate bioluminescence. It deals with chemistry in the fluorescent states of the emitting molecule (coelenteramide). This molecule can change its acidity in the fluorescent states since the lifetime of these states is longer than time of proton transfer. Several fluorescent forms of coelenteramide can be formed depending on its ionization degree. That is why the spectra of coelenterate bioluminescence are broad and complex; they include spectral components of various forms of coelenteramide in a broad spectral region. The spectral components of coelenterate bioluminescence (from jellyfish *Aequorea victoria* and hydroid *Obelia longissima*) were determined and characterized. The results are discussed taking into consideration the proton transfer in the fluorescent states of the emitting molecule and aminoacid surrounding of the emitter in the enzymes.

Д5.11

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЦИС-ТРАНС ИЗОМЕРИЗАЦИИ ХРОМОФОРА ЗЕЛЕННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА

Игорь ПОЛЯКОВ¹, Белла ГРИГОРЕНКО¹,
Александр МОСКОВСКИЙ^{1,2}, Александр НЕМУХИН^{1,2}

¹Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/3, Москва, 119992, Россия
E-mail: polyakoviv@gmail.com; Тел: +7-495-939-48-40

²Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, улица Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

Мы применяем современные методы квантовой химии для моделирования реакции цис-транс изомеризации хромофора зеленого флуоресцентного белка (HBDI) в газовой фазе. Путем сравнения результатов расчетов методами DFT(PBE0) и CASSCF(12/11) показано, что необходимо использовать многоконфигурационные приближения квантовой химии для правильного описания электронной структуры основного состояния и для расчетов барьера изомеризации в газовой фазе и водной среде.

В водной среде мы исследуем данную реакцию с помощью различных континуальных моделей растворителя (D-PCM, C-PCM, SVPE) и с помощью комбинированного метода квантовой и молекулярной механики (KM/MM) в вариантах теории эффективных фрагментов и метода электронного внедрения. Показано, что только лишь результаты, полученные в модели SVPE, хорошо согласуются с экспериментальными данными [1]. Расчет в модели KM/MM с эффективными фрагментами проводился при использовании стандартных параметров для фрагментов – молекул воды в программе PC GAMESS [2]. При расчетах в рамках модели KM/MM электронного внедрения для учета взаимодействий молекул воды в молекулярно-механической части системы использовались параметры модели TPR3P. Результаты, полученные в последнем случае, находятся в хорошем согласии с экспериментальными данными [1].

Нами также проведено моделирование фрагментов поверхностей потенциальной энергии основного и возбужденного электронного состояний хромофора HBDI в газовой фазе. Показано, что и в случае цис-, и в случае транс-изомера путем поворота по мостиковым связям с небольшим барьером хромофор попадает на коническое пересечение поверхностей основного и первого возбужденного состояния.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 07-03-00059.

Авторы выражают благодарность программе СКИФ-ГРИД и межрегиональному вычислительному центру Томского государственного университета за предоставленное машинное время суперкомпьютера СКИФ-Сибирь.

1. Xiang He, Alasdair F. Bell, Peter J. Tonge, FEBS Letters, 2003, 549.

2. A. A. Granovsky, PC GAMESS, version 7.1, <http://classic.chem.msu.su/gran/games>

Д5.12

ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТОВ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА mRFP1 И РАСЧЕТ ИХ СТРУКТУР МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Екатерина **ХРАМЕЕВА**¹, Валерий **ДРУЦА**², Евгений **ВРЖЕЩ**¹,
Денис **ДМИТРИЕНКО**³, Петр **ВРЖЕЩ**^{1,3}

¹Факультет бионинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, Москва, 119992, Россия
E-mail: khrameeva@yandex.ru; факс: (495)939-4218.

²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, Россия

³Международный биотехнологический центр МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В настоящее время флуоресцентные белки являются наиболее широко используемыми маркерами для визуализации клеточных процессов. Экспрессией клонированных мутированных генов mRFP1 с последующим выделением на Ni-содержащей агарозе нами были получены мутанты белка mRFP1 с заменами по 66 положению на остатки аланина, лейцина, серина, цистеина, гистидина и аспарагина, а также определены их оптические свойства.

Чтобы исследовать взаимосвязь между структурой и оптическими свойствами флуоресцентных белков, с использованием квантово-химических расчетов *ab initio* были получены параметры потенциалов нейтральной формы хромофора флуоресцентного белка DsRed для силового поля OPLS-AA. На их основе методом молекулярной динамики были рассчитаны структуры полученных нами белков с помощью программного пакета GROMACS.

Для хромофоров белков и их 6Å окружений был осуществлен глобальный поиск корреляций геометрических параметров структур с определенными нами оптическими свойствами. Наиболее высокие коэффициенты корреляции (0,81–0,87) были обнаружены для торсионных углов, входящих в состав фенольного и имидазолидинового колец, а также располагающихся в областях присоединения фенольного кольца к имидазолидиновому кольцу и хромофора к бета-бочонку.

Найденные корреляции позволят прогнозировать оптические свойства флуоресцентных белков на основании их структур, а также выделять позиции, наиболее важные для направленного мутагенеза. В окружении хромофора наиболее интересной для направленного мутагенеза представляется 211-я позиция (GLN211).

Д5.13

НОВЫЕ КРАСНЫЕ И ДАЛЬНЕ-КРАСНЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ

Дмитрий ЧУДАКОВ, Дмитрий ЩЕРБО

Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и
Ю.А.Овчинникова РАН, Москва, 117997, Россия
E-mail: chudakovDM@mail.ru; FAX: 8-495-330-70-56

За последние несколько лет в области разработки красных и дальне-красных флуоресцентных белков произошел значительный прорыв. Впервые были получены мономерные варианты красных и дальне-красных флуоресцентных белков, позволяющие осуществлять мечение изучаемых белков в живых клетках. Такие белки высоко востребованы как для многоцветного окрашивания, так и для FRET (Forster Resonance Energy Transfer) технологий. Также впервые были получены дальне-красные варианты флуоресцентных белков, обладающие высокой яркостью флуоресценции. Такие варианты необходимы для визуализации сигнала в интактных тканях модельных животных, а в перспективе могут также найти применение в медицинской практике.

Д5.14

ПЕРОКСИД ВОДОРОДА КАК ВТОРИЧНЫЙ МЕССЕНДЖЕР: ИССЛЕДОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИНДИКАТОРА

Всеволод Вадимович БЕЛОУСОВ

Лаборатория молекулярных технологий для биологии и медицины, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, 117997
E-mail: vsevolodbelousov@yandex.ru; факс +7-495-3307056

Фагоцитирующие клетки, такие как нейтрофилы и макрофаги, представляют собой первую линию защиты организма от патогенов бактериальной природы и других простейших микроорганизмов. Фагоциты поглощают патогены, заключая их в эндоцитарную вакуоль, из которой в дальнейшем формируется фагосома, где патоген разрушается. Многие годы основным механизмом инактивации патогенов в фагосоме считалось окисление активными формами кислорода. Эта гипотеза нашла основное подтверждение в природе хронического гранулематоза (ХГ). Пациенты, несущие ХГ имеют дефект в ферменте НАДФН-оксидаза (NOX) плазматической мембраны фагоцитов и не способны эффективно бороться с инфекциями, вызываемыми патогенами бактериальной и дрожжевой природы. Однако в последние годы было показано, что инактивация патогенов в фагосоме является следствием электрогенной функцией NOX. Супероксид и пероксид водорода были объявлены побочными продуктами NOX-зависимого транспорта электронов через мембрану фагосомы.

Вместе с тем, большое количество научных данных позволяет предположить сигнальную функцию пероксида водорода. Наиболее изученным примером является селективная инактивация пероксидом водорода тирозинфосфатаз, что является необходимым компонентом активации MAP киназ при стимуляции клеток ростовыми факторами и цитокинами.

Мы исследовали продукцию пероксида водорода при фагоцитозе в режиме реального времени с помощью генетически кодируемого флуоресцентного индикатора НуPer. Мы обнаружили, что при фагоцитозе опсонизированного зимозана клетки на короткое время (10 мин) повышают продукцию пероксида водорода. Профиль генерации пероксида водорода, детектированный с помощью индикатора, принципиально отличается от такового, получаемого с помощью методов внеклеточной детекции активных форм кислорода, позволяющих детектировать ответ всей популяции клеток. Профиль и временные границы генерации пероксида водорода с помощью наносенсора НуPer позволяет предполагать сигнальную функцию этой молекулы в макрофагах.

Д5.15

ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ АМНИОТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ. ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ.

**Екатерина СЛОБОЖАНИНА¹, Наталья КОЗЛОВА¹,
Леонид КАСЬКО²**

¹ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, 220072, Беларусь

E-mail: sei@biobel.bas-net.by; FAX: 375-017-284-23-59

²ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, 220005, Беларусь

Данная работа посвящена изучению люминесценции амниотической жидкости (АЖ) беременных с целью выяснения вопроса, можно ли по люминесцентным характеристикам АЖ выявить беременных с риском врожденных заболеваний у потомства.

Проведен спектрально-люминесцентный анализ АЖ женщин с нормально протекающей беременностью и женщин с патологией беременности (врожденные пороки развития плода; беременность, осложненная резус-конфликтом; гестозы). Установлено, что АЖ обладает интенсивной ультрафиолетовой люминесценцией, обусловленной в основном триптофанилами белков. Наряду со свечением белков в АЖ люминесцируют и другие соединения в области 380–650 нм, с максимумами при 430–450 нм и 520–560 нм. Показано, что интенсивность и положение максимумов спектров ультрафиолетовой люминесценции АЖ при нормально протекающей беременности и при беременности, осложненной синдромом задержки развития плода, не различаются. Обнаружено, что как положение максимумов спектров люминесценции, так и спектров возбуждения люминесценции АЖ в видимой области при беременности, осложненной синдромом задержки развития плода или резус-конфликтом, сдвинуты в длинноволновую область по сравнению с нормой. С помощью флуоресцентного зонда, специфичного к тиоловым группам, а также ряда липофильных флуоресцентных зондов, выявлено, что при патологии беременности, связанной с пороками развития плода, а также при беременности, осложненной резус-конфликтом или гестозами, происходит снижение уровня SH-групп белков и изменение физического состояния липидных компонентов в АЖ. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о важности и перспективности применения спектрально-люминесцентных характеристик АЖ для разработки способов выявления беременных с нарушениями развития плода. Выявленные отличия люминесцентных параметров АЖ при патологии беременности явились основой для разработки экспресс-метода определения внутриутробных нарушений развития плода.

Авторы благодарят за финансовую поддержку БРФФИ (Б03-297 и Б07-319).

**ЦЕЛЕНТЕРАЗИН-ЗАВИСИМЫЕ БЕЛКИ
ДЛЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО МИКРОАНАЛИЗА [*Hfcb*****Людмила ФРАНК, Василиса БОРИСОВА**

Институт биофизики СО РАН, Красноярск, Академгородок, 660036, Россия;
E-mail: lfrank@yandex.ru; FAX: 8-3912-433400

Целентеразин (СЕ) и его производные являются наиболее широко распространенными люциферинами среди известных морских светящихся организмов. Среди них наиболее изученными являются биолюминесцентные системы кишечнорастных – медузы *Aequorea*, гидроидного полипа *Obelia* и мягкого коралла *Renilla*, а также ракообразные *Metridia*. Биолюминесценция первых двух организмов обусловлена наличием так называемых Ca^{2+} -регулируемых фотопротеинов, представляющих собой устойчивый фермент-субстратный комплекс из апопротеина и пероксицелентеразина. Присоединение ионов кальция вызывает конформационные изменения молекулы, в результате которых происходит реакция декарбоксилирования пероксицелентеразина, конечными продуктами которой являются целентерамид, CO_2 и квант света ($\zeta_{max} = 480\text{nm}$). Благодаря высокому квантовому выходу, низкому уровню шума, не ограниченному линейному диапазону сигнала, доступности рекомбинантных белков и стабильности при модификациях и хранении фотопротеины нашли широкое применение как эффективные репортеры *in vitro* – в иммуно- и ДНК-гибридизационном анализе. При этом спектр анализируемых веществ весьма широк – гормоны, патогенные организмы, вирусы.

Целентеразин-зависимые люциферазы *Renilla* и *Metridia* широко используются как репортеры *in vivo*. При этом реакцию инициируют добавлением свободного СЕ. Однако известно, что в природе у *Renilla* целентеразин локализован в полости Ca^{2+} -зависимого целентеразин-связывающего белка (СВР). Присоединение к СВР ионов кальция делает СЕ доступным для окисления, катализируемого люциферазой (ζ_{max} биолюминесценции – 480нм). Нами было показано, что СВР является более эффективным, чем свободный целентеразин «субстратом» не только для люциферазы *Renilla*, но и для люциферазы *Metridia*. Модельные эксперименты демонстрируют применимость этих белков (СВР и люциферазы *Metridia*) для анализа *in vitro* в том числе и в тандеме с фотопротеиновыми репортерными белками.

ИЗУЧЕНИЕ КВАНТОВОМЕХАНИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ ОБРАЗОВАНИЯ ХРОМОФОРА В ЗЕЛЕНОМ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОМ БЕЛКЕ

Дмитрий РОЩУПКИН¹, Марина МУРИНА²

¹ГОУ ВПО “Российский государственный медицинский университет Росздрава”,
Москва, ул. Островитянова, д.1, 117997

E-mail: marina_murina@mail.ru; FAX: +7-495-434-47-10

²ФГУ “НИИ физико-химической медицины”, Москва, Россия

В зеленом флуоресцентном белке (ЗФР) хромофор образуется трипептидом Сер65-Тир66-Гли67. Начальная стадия хромогенного процесса представляет собой нуклеофильную реакцию амидной группы глицина с карбонильной группой серина с образованием цикла. Глицин является консервативной аминокислотой в хромогенных трипептидах других белков семейства ЗФР. Чтобы подойти к выяснению такой исключительной роли глицина, было проведено исследование фрагмента ЗФР Тре-Фен-Сер-Тир-Гли-Вал-Гли и ряда мутантных пептидов, в основном, с заменой глицина. Исходную 3-х мерную структуру пептидов брали в форме, соответствующей стандартным значениям длин и углов связей. Вначале параметрическим методом РМЗ проводили глобальную минимизацию энергии (теплоты образования) или минимизацию энергии до переходного состояния (седла). Затем для этих состояний полуэмпирическим методом АМ1 проводили компьютерные расчеты парциальных электрических зарядов атомов в рамках молекулярного электростатического потенциала. Величина этих зарядов зависит от конфигурации молекулы и указывает на реакционную способность атомных групп. Это было подтверждено экспериментально на аминокислотных хлораминах по критерию дезаминирования. Для природного гексапептида ЗФР расчет показывает наличие переходного состояния, энергия которого превышает энергию глобального минимума примерно на 1200 кДж/моль. При таком энергетическом барьере циклизация пройдет достаточно быстро, если в переходном состоянии увеличивается энтропия. Глицин определенно выделяется из изученного ряда Иле, Вал, Сер, Лей, Тре, Ала в мутантных пептидах: его сумма зарядов атомов амидной группы «С NH» отрицательная (около -0,38), но наибольшая по модулю. Это указывает, что глицину самому по себе свойственна повышенная реакционная способность. К глицину близко примыкает изолейцин. Возможно, что в мутантном белке в форме Гли67Иле может эффективно протекать реакция циклизации. Работа частично выполнена по Госконтракту № 02.512.11.2191 с Федеральным агентством по науке и инновациям.

C5.2

**ПОЛУЧЕНИЕ ОПУХОЛЕВОЙ КЛЕТОЧНОЙ МЕЛАНОМЫ
ЛИНИИ ? 7>=AD, СТАБИЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ КРАСНЫЙ
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БЕЛОК TURBORFP
В УСЛОВИЯХ ; @HHA И ; @HFDA**

**Ляйсан АРСЛАНБАЕВА, Ирина МЕЕРОВИЧ,
Александр САВИЦКИЙ**

Учреждение Российской академии Институт Биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071,
г. Москва, Ленинский пр., д.33, к.2
E-mail: arslanbaeva@mail.ru;

Создание экспериментальной модели человеческой опухоли, которая экспрессирует красный флуоресцентный белок, позволит изучать разнообразные опухолевые процессы, такие как первичный опухолевый рост, метастазирование, ангиогенез и действие противоопухолевых препаратов.

Цель работы: получение опухолевой клеточной линии человека линии *melKor*, которая стабильно экспрессирует красный флуоресцентный белок TurboRFP.

Опухолевые клетки линии *melKor* были трансфицированы плазмидой pTurboRFP-C1 методом липосомальной трансфекции. Стабильно экспрессирующие клетки отбирали с помощью селективного антибиотика генетицина. С целью получения клеток, которые наиболее ярко и равномерно между собой экспрессируют белок TurboRFP, получали потомство одного клона. Полученные клетки обладали яркой флуоресценцией. Длительное выращивание в отсутствие селективной среды, показало, что интенсивность флуоресценции клеток после проведения 20 пассажей. Проведенный ПЦР-анализ, с помощью которого определялось количество плазмиды на клетку, показал, что после 20 пассажей количество плазмиды на клетку начинает падать. Следовательно, клетки в течение 20 пассажей стабильно экспрессируют белок, после чего необходимо проводить реклонирование ярко флуоресцирующих клеток.

Полученные реклонированные флуоресцирующие клетки, обладающие яркой флуоресценцией, были введены подкожно мышам линии Nu/Nu. На 32й день после инокуляции клеток, мышь была умерщвлена, опухоль вырезана и нарезана на слайды. Изучение слайдов показало, что опухоли ярко флуоресцируют.

Выводы: клетки линии *melKor*, способны образовывать опухоль в мышцах линии Nu/Nu; полученные опухоли ярко флуоресцируют в течение длительного времени.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОВЕРКА ГИПОТЕЗЫ ОБ АКТИВНОСТИ ВЫСШИХ ЭЛЕКТРОННО-ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ В БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ КИШЕЧНОПОЛОСТНЫХ

Надежда БЕЛОГУРОВА¹, Надежда КУДРЯШЕВА^{1,2}, Роза АЛИЕВА²

¹Институт биофизики СО РАН, 660036, Россия, Красноярск. Академгородок 50,
E-mail: nbelogurova@mail.ru; факс: +7-3912-43-34-00

²Сибирский федеральный университет

Эмиттеры биолюминесценции всех видов представляют собой гетероциклические молекулы, характеризующиеся высоким выходом флуоресценции; уровни энергии их пф*-состояний не являются низшими. Существует вероятность участия в биолюминесцентном процессе указанных пф*-состояний, формирующихся электронными подсистемами карбонильных групп молекулы, т.к. именно карбонильные группы образуются в реакциях окисления органических соединений, к которым относятся биолюминесцентные процессы. Гипотеза участия высших электронно-возбужденных состояний молекулы эмиттера биолюминесценции в биолюминесцентном процессе впервые была предложена Д.Н. Шигориным и Н.С. Куряшевой. К настоящему времени данная гипотеза подтверждена для биолюминесценции бактерий. Не найдены высшие возбужденные состояния в биолюминесценции светляков, что вероятно связано с высокой эффективностью внутримолекулярной миграцией энергии в эмиттере.

Цель предлагаемой работы состоит в экспериментальном подтверждении гипотезы об активности высших электронно-возбужденных состояний эмиттера биолюминесценции кишечнорастворимых. Изучены биолюминесцентные спектры мутанта обелина F88H в присутствии ряда флуоресцентных красителей (пирен, нафталин, 2-метоксинафталин), энергия флуоресцентного состояния которых выше, чем энергия флуоресцентного состояния биолюминесцентного эмиттера. Спектры поглощения данных красителей не пересекаются со спектром биолюминесценции, что исключает тривиальную абсорбцию и межмолекулярный резонансный S-S перенос. Все три красителя показали слабую сенсibilизированную флуоресценцию в процессе биолюминесцентной реакции. Полученные результаты доказывают активность высших электронно-возбужденных состояний в биолюминесценции кишечнорастворимых.

**ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ ФОТОКОНВЕРСИЯ ЗЕЛЁНОГО
ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА****Алексей БОГДАНОВ, Александр МИШИН, Константин ЛУКЪЯНОВ**

Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН, Миклухо-Маклая 16/10, 117997 Москва, Россия
E-mail: noobissat@ya.ru; FAX: +7-495-330-70-56

В 1997 году американскими и французскими исследователями [Elowitz et al. *Curr. Biol.* 1997, 7, 809–812] был обнаружен процесс фотоконверсии зелёного флуоресцентного белка дикого типа (wt GFP) и его мутантов в красную флуоресцентную форму (максимум возбуждения при 525 нм, максимум эмиссии при 600 нм). Данное явление было зафиксировано как в растворе, так и в живых клетках, и требовало во всех случаях бескислородных условий. Изучая светоиндуцируемые превращения белка EGFP (enhanced GFP), мы обнаружили новый тип фотоконверсии. Оказалось, что красная форма (максимум возбуждения при 575 нм, максимум эмиссии при 607 нм) была способна образовываться в принципиально иных, а именно, окислительных условиях, например, в присутствии красной кровяной соли, бензохинона и других электронных акцепторов. От присутствия кислорода подобный процесс не зависит. Интересно, что интенсивность флуоресценции красной формы, образующейся окислительным путём, была существенно выше той, что достигается в бескислородных условиях. Необходимо отметить, что в окислительных условиях красную форму образуют далеко не любые зелёные флуоресцентные белки: среди исследованных нами способность к окислительной фотоконверсии проявили только EGFP и AceGFP (последний заметно хуже). Нам удалось воспроизвести обнаруженный эффект в эукариотических клетках и показать заметную гетерогенность индивидуальных клеток в отношении интенсивности и кинетики формирования красной формы. Таким образом, нами была впервые продемонстрирована фотоконверсия флуоресцентных белков, основанная на окислительно-восстановительных реакциях с неорганическими и органическими окислителями, в том числе присутствующими в живой клетке.

C5.5

**ПЕРВЫЙ ВАРИАНТ GFP МЕДУЗЫ *37CGAD73 H5FAD3*
С ПИКОМ ЭМИССИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В КРАСНОЙ
ОБЛАСТИ СПЕКТРА**

**Александр МИШИН¹, Федор СУБАХ², Владислав ВЕРХУША²,
Константин ЛУКЬЯНОВ¹**

¹Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН, Миклухо-Маклая 16/10, 117997 Москва, Россия;
E-mail: a.s.mishin@gmail.com; FAX: +7-495-330-70-56

²Department of Anatomy and Structural Biology and Flow Cytometry Core Facility,
Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York 10461

Зеленый флуоресцентный белок (GFP) медузы *Aequorea victoria* и его мутанты широко используются в биомедицинских исследованиях в качестве флуоресцентных маркеров. Несмотря на колоссальные усилия академических и коммерческих организаций, направленные на получение вариантов GFP с флуоресценцией в красной области спектра, наибольший достигнутый батохромный сдвиг по сравнению с GFP дикого типа составляет всего лишь 20 нм (максимум эмиссии – 529 нм). Мы использовали новую стратегию молекулярной эволюции, основанную на современных представлениях о механизме образования хромофора красного флуоресцентного белка DsRed, применив которую, впервые удалось получить варианты GFP содержащие форму с флуоресценцией в красной области спектра (максимум возбуждения флуоресценции – 555 нм, максимум эмиссии – 585 нм). На основании анализа аминокислотных замен в этих вариантах и компьютерного моделирования был предложен новый неокислительный механизм образования хромофора с красной флуоресценцией, включающий дегидратацию боковой цепи серина в 65-м положении. Показана возможность применения одного из полученных вариантов, R10-3, в качестве дополнительной двуцветной флуоресцентной метки при экспрессии в клетках млекопитающих и проточной цитофлуориметрии.

РОЛЬ 178 ПОЛОЖЕНИЯ В ФОРМИРОВАНИИ ХРОМОФОРА KFP

**Александр Л. РУСАНОВ^{1,2}, Татьяна В. ИВАШИНА³,
Александр П. САВИЦКИЙ^{1,2}**

¹Учреждение Российской академии Институт Биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, г. Москва, Ленинский пр., д.33, к.2

E-mail: alex_gusanov@inbi.ras.ru

²Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, 119991, г. Москва, Воробьевы горы, д.1, стр. 3

³Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино, Московская область, Россия

Квантовый выход флуоресценции красного белка KFP можно существенно увеличить при облучении интенсивным зелёным светом. Это явление, названное «разгорание», обратимо, в темноте хромофор возвращается в исходное нефлуоресцирующее состояние. Теоретические расчёты показывают, что остаток в 178 положении, который находится в непосредственной близости от хромофора, может влиять на эффективность «разгорания».

Целью исследования являлось получение мутанта KFP по этому положению и изучение свойств нового белка.

В исходном белке в данной позиции находится тирозин. Была произведена замена тирозина 178 на фенилаланин. Ген белка, содержащий 6xHis фрагмент на N-конце, экспрессировали в клетки *E.coli*. После выделения белок подвергался очистке с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе (Qiagen) градиентом концентраций имидазола от 20 до 250 мМ. Наличие и чистота белка были показаны с помощью денатурирующего электрофореза.

При этом введение данной мутации приводит к потере флуоресцентных свойств белка. Эксперименты по динамическому светорассеянию показали, что белок существует в виде сильноагрегированных частиц, в то время как KFP существует преимущественно в виде тетрамера.

Таким образом, 178 позиция действительно играет важную роль в появлении и свойствах флуоресценции KFP, а также оказывает влияние на агрегатные свойства белка.

СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИНДИКАТОРА ДЛЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ДЕТЕКЦИИ ОКСИДА АЗОТА

Наталья САФРОНОВА, Всеволод БЕЛОУСОВ

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва 117997, Россия
E-mail: natsafr@yandex.ru

Оксид азота (NO) вовлечен в регуляцию таких фундаментальных явлений, как эмбриональное развитие, воспалительные реакции, иммунный ответ и его нарушения при аутоиммунных заболеваниях и многих других важных для функционирования организма человека процессов.

В настоящий момент не существует методов, позволяющих напрямую проводить измерение концентрации NO и наблюдать его динамику в живых клетках. Методы, основанные на химической колориметрической детекции нитритов и нитратов, образующихся из NO во внеклеточной среде, трудоемки, малочувствительны и не применимы для прямых измерений. Наиболее чувствительные методы основаны на использовании NO-селективных электродов, однако они позволяют детектировать только внеклеточный оксид азота. Методы, использующие химические флуоресцентные красители для детекции NO внутри живой клетки, обладают низкой специфичностью к NO. Попытки создать индикаторы оксида азота на основе зеленого флуоресцентного белка (GFP) не увенчались успехом, поскольку полученные химерные белки либо были неспецифичными (GFP-металлотионеин), либо показывали слишком маленькое изменение флуоресцентного сигнала в ответ на NO (простой химерный белок GFP-sGC).

Мы подошли к решению вышеперечисленных методических проблем путем создания генетически кодируемого флуоресцентного индикатора для детекции NO в живых клетках, состоящего из циклически пермутированного желтого флуоресцентного белка (cpYFP), интегрированного в гем-связывающий домен растворимой гуанилатциклазы (sGC). Мы предположили, что в подобном химерном белке конформационные изменения чувствительного высокоспецифичного домена sGC при его взаимодействии с NO будут передаваться на окружение хромофора cpYFP, меняя спектральные свойства последнего. Мы показали, что изменения спектральных свойств флуоресцентного индикатора отражают изменения уровня NO в изучаемой системе, что позволяет вести мониторинг внутриклеточного NO в режиме реального времени в живых клетках. Разработанная схема создания биосенсора может быть использована для конструирования генетически кодируемых индикаторов для других вторичных мессенджеров.

**ОБРАТИМО ФОТОКОНВЕРТИРУЕМЫЙ МОНОМЕРНЫЙ КРАСНЫЙ
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БЕЛОК**

**Лицэюань ЧЖАН, Надежда ГУРСКАЯ, Елена КОПАНЦЕВА,
Константин ЛУКЪЯНОВ**

Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН, Миклухо-Маклая 16/10, 117997 Москва, Россия
E-mail: weili54@gmail.com; FAX: +7-495-330-70-56

На базе нескольких хромобелков коралловых полипов, в нашей лаборатории была разработана группа обратимо фотоактивируемых флуоресцентных белков – KFP (Kindling Fluorescent Protein – «разгорающийся» флуоресцентный белок). Исходно нефлуоресцентные, эти белки на несколько минут становятся флуоресцентными в ответ на облучение интенсивным светом определенной длины волны. Разожженные KFP флуоресцирует в красной области спектра. Основным недостатком KFP является тетрамерная природа этих белков, что затрудняет их использование в качестве метки для слежения за перемещением клеточных белков.

Для получения мономерного варианта KFP мы использовали направленный и случайный мутагенез мономерного красного флуоресцентного белка TagRFP, полученного в нашей лаборатории ранее. При анализе библиотек *E. coli*, экспрессирующих мутантные варианты TagRFP, был найден клон, демонстрирующий новый тип фотоконверсии. Новый красный флуоресцентный белок, названный iKFP (inverse KFP), обладал флуоресценцией в красной области спектра (максимум возбуждения при 585 нм, максимум эмиссии при 612 нм) и проявлял свойства обратимого тушения флуоресценции при облучении зеленым светом и возвращения во флуоресцентное состояние при облучении синим светом. Яркость флуоресценции активированного и потушенного iKFP различалась в 10 раз, что в основном определялось изменением квантового выхода флуоресценции. В данном сообщении будут подробно рассмотрены спектральные характеристики и фотоконверсия iKFP *in vitro* и *in vivo* (в клетках млекопитающих), а также перспективы использования и дальнейших модификаций обратимо фотоконвертируемых флуоресцентных белков.

C5.9

РОЛЬ ОСТАТКОВ ЦИСТЕИНА ЛЮЦИФЕРАЗЫ СВЕТЛЯКОВ >Z ; @9D7>; 53В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ФЕРМЕНТА

Ю.А. МОДЕСТОВА, Г.Ю. ЛОМАКИНА, Н.Н. УГАРОВА

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991, Россия
E-mail: lomakinagalina@yahoo.com; FAX: +7 (495)939-26-60

Люцифераза светляков катализирует окисление D-люциферина (LH₂), кислородом воздуха в присутствии АТФ и ионов Mg²⁺ и является одним из высокоспецифичных биокатализаторов и эффективных преобразователей энергии биохимической реакции в свет, что обуславливает её широкое биоаналитическое применение. Люциферазы содержат от 4 до 13 свободных реакционно-способных SH-групп остатков цистеина. Предполагается, что значительные различия в стабильности люцифераз связаны с количеством остатков цистеина. Целью данной работы являлось выяснение роли остатков неконсервативных остатков Cys62, 146 и 164 в функционировании люциферазы светляков *Luciola mingrelica*.

Мутантные формы люциферазы светляков *L. mingrelica* с единичными заменами Cys62, 146 и 164 на Ser получены сайт-направленным мутагенезом. Показано, что мутации не повлияли на каталитические свойства фермента и сродство к субстратам ($K_{m,LH_2} = 20 \pm 3 \mu\text{M}$ and $K_{m,ATP} = 0,18 \pm 0,04 \text{ mM}$). Спектры собственной флуоресценции ($\zeta_{\text{макс}} = 340 \text{ нм}$) исходной люциферазы и ее мутантных форм также практически не отличались друг от друга. Данные остатки цистеина удалены от активного центра фермента более чем в 30Å, по-видимому, они не оказывают заметного влияния на конформацию субстрат-связывающих участков и микроокружение остатка Trp419, расположенного вблизи активного центра.

Определены константы скорости быстрой и медленной стадии термоинактивации для исходного и мутантных ферментов при 37°C в отсутствие и в присутствии 12 мМ дитиотреитола (ДТТ). Показано увеличение стабильности мутантных форм люциферазы в несколько раз по сравнению с исходным ферментом. При этом, в отличие от исходного фермента, мутанты оказались нечувствительными к присутствию ДТТ. Сделан вывод об участии остатков Cys62, 146 и 164 в окислительной инактивации люциферазы.

Работа финансируется РФФИ (Грант 08-04-00624).

Секция 6:

**Современные оптические методы
в фотобиологии**

Тезисы докладов

Д6.1

ПОЛИМЕТИНОВЫЕ КРАСИТЕЛИ КАК СПЕКТРАЛЬНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ И КИНЕТИЧЕСКИЕ ЗОНДЫ ДЛЯ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ

Александр ТАТИКОЛОВ

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва,
ул. Косыгина, 4, 119334, Россия
E-mail: tatikolov@sky.chph.ras.ru; FAX: +7-499-1374101

Рассматривается использование полиметиновых (цианиновых) красителей в качестве спектрально-флуоресцентных и кинетических зондов для биомакромолекул (ДНК, белков), основанное на нековалентных взаимодействиях их молекул. Связывание полиметиновых красителей с биополимерами обычно приводит к батохромному сдвигу спектров поглощения (и флуоресценции) и росту квантового выхода флуоресценции. Связывание в ряде случаев сопровождается ростом интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние ($S_1 \rightarrow T$). Эти эффекты объясняются затруднением процессов безызлучательной дезактивации молекул красителей, которые становятся более жесткими при связывании с биополимерами. Катионные красители, такие как тиазоловый оранжевый, оксазоловый желтый и их производные, служат хорошими спектрально-флуоресцентными зондами для ДНК, в то время как анионные полиметиновые красители (цианины с сульфогруппами, оксонолы, тетрацианополиметины) эффективно взаимодействуют с альбумином. Скварилиевые красители могут также служить спектрально-флуоресцентными зондами на сывороточные альбумины. Некоторые цианины взаимодействуют с коллагенами с образованием J-агрегатов. На основе одного из анионных цианиновых красителей, используемого в качестве спектрально-флуоресцентного зонда, нами разработан простой и селективный метод обнаружения альбумина и коллагенов во внеклеточных средах организма. Поскольку для ряда полиметиновых красителей кинетика элементарных фотохимических процессов в их молекулах (фотоизомеризация и обратная темновая изомеризация фотоизомера, выход в триплетное состояние) сильно зависит от среды, их можно использовать в качестве кинетических зондов на биомакромолекулы, с которыми они связываются. При этом красители-зонды указывают не только на присутствие биомакромолекул в исследуемой среде, но и чутко реагируют на молекулярное окружение в центрах связывания биомакромолекул.

Работа поддержана грантом фундаментальных исследований Президиума РАН.

**ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ И СЕЛЕКТИВНАЯ
ФОТОТЕРМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ УГРЕВОЙ СЫПИ**

**Валерий В. ТУЧИН^{1,2}, Элина А. ГЕНИНА¹, Елена С. ТУЧИНА¹,
Алексей Н. БАШКАТОВ¹, Георгий В. СИМОНЕНКО¹,
Вера Н. ШЕРСТНЕВА³, Илья В. ЯРОСЛАВСКИЙ^{1,4},
Григорий Б. АЛЬШУЛЕР⁴**

¹Саратовский государственный университет, 410012, Саратов, ул. Астраханская, д. 83, Саратов
E-mail: tuchin@sgu.ru; Тел: +7-8452-210-722

²Институт проблем точной механики и управления РАН, 410028, Саратов, ул. Рабочая, д. 24

³Саратовский государственный медицинский институт, 410012, Саратов, ул. Б. Казачья, д. 112

⁴Palomar Medical Technologies Inc., 82 Cambridge str., Burlington, MA 01803, USA

Представлены технологии светолечения угревой сыпи (*acne vulgaris*), учитывающие патогенез, особенности физиологии и структурных изменений биологической ткани в процессе развития заболевания. В зависимости от тяжести заболевания выбирается та или иная стратегия лечения. Светолечение может быть направлено на подавление патогенной микрофлоры *Propionibacterium acnes* или продуктивной способности сальной железы.

В первом случае реализуется фотодинамическая терапия с использованием эндогенных порфиринов, накапливаемых в анаэробных бактериях, с использованием синего света ярких светодиодов (405 нм), или с использованием экзогенных красителей (метиленовый синий в комбинации с лазерным или светодиодным излучением, 625–660 нм) или индоцианин зеленый (ИЗ) в комбинации с инфракрасным излучением диодного лазера (805 нм). Во втором случае используется селективный фототермолиз с использованием предварительного окрашивания сальной железы раствором ИЗ и излучения диодного лазера (805 нм) высокой плотности мощности (18–200 Вт/см²).

Оптические технологии использовались также для повышения проницаемости кожи для более эффективной доставки лекарственных препаратов через кожу, которые обычно используются при лечении угревой сыпи. Проведено экспериментальное обоснование предложенных методик лечения, в частности, путем проведения микробиологических исследований *in vitro* по подавлению микрофлоры *Propionibacterium acnes*, а также клинические исследования на 50 пациентах.

Д6.3

БЕЗЫЗЛУЧАТЕЛЬНЫЙ ПЕРЕНОС ЭНЕРГИИ В КОМПЛЕКСАХ КАРБОЦИАНИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ И ДНК

Павел ПРОНКИН, Александр ТАТИКОЛОВ

Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН, Москва, 119334,
Россия
E-mail: pronkinp@mail.ru; Tel: +7-495-93-971-05

Благодаря высокой чувствительности, характерной для флуоресцентных аналитических методик, перенос энергии электронного возбуждения (ПЭЭВ) привлекает пристальное внимание исследователей. Эксперименты по ПЭЭВ особенно интересны для изучения пространственных структур биологических систем. Отметим, что перенос энергии в парах красителей, образующих нековалентные комплексы на поверхности ДНК (например, в малом желобе) практически не изучался. В литературе также мало внимания уделяется роли взаимной ориентации молекул в парах донор-акцептор, которая определяется уникальной структурой двойной спирали молекулы ДНК.

В настоящей работе изучался ПЭЭВ между молекулами карбоцианиновых красителей в нековалентных комплексах. В ходе экспериментов молекула ДНК выступала в качестве матрицы для встраивания молекул красителей, облегчающей перенос энергии, поскольку красители-лиганды в такой системе сближены. В качестве объектов для изучения межмолекулярного ПЭЭВ полиметиновых красителей в комплексе с ДНК были выбраны два красителя: 3,3',9-триэтил-5,5'-диметиллоксакарбоцианиниодид (донор) и 3,3'-диэтилтиакарбоцианиниодид (акцептор).

Эксперименты проводились в широком диапазоне концентраций ДНК (10^{-6} – $5 \cdot 10^{-4}$ моль л⁻¹). Обнаружено, что в области относительно низких концентраций биополимера ($< 3 \cdot 10^{-5}$ моль л⁻¹) эффективность ПЭЭВ (τ) остается постоянной, дальнейшее увеличение концентрации ДНК приводит к падению τ . Экспериментальные данные были интерпретированы как с позиции стехиометрического комплекса, так и с точки зрения псевдофазной модели.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРЕННИХ СРЕД ОРГАНИЗМА С ПОМОЩЬЮ
ФОТОХИМИЧЕСКИХ ЗОНДОВ****Ина ПАНОВА¹, Петр ЛЕВИН², Александр ТАТИКОЛОВ²**

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, ул. Вавилова, 26, 119334, Россия

E-mail: pinag@mail.ru; FAX: +7-499-1358012

²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, ул. Косыгина, 4, 119334, Россия;

Для оценки динамики изменения внутренних сред организма и внеклеточного матрикса органов и тканей в процессе нормального развития, а также оценки патогенеза различных заболеваний, необходима разработка новых методических подходов. На основе анионного цианинового красителя (пиридиниевая соль 3,3'-ди-(*v*-сульфопропил)-4,5,4',5'-добензо-9-этилтиакарбодиазин-бетаина), используемого в качестве спектрально-флуоресцентного зонда, нами разработан простой и селективный метод обнаружения альбумина и коллагенов во внеклеточных средах организма. Рибофлавин, являясь природным соединением (витамин В₂), обладает фотохимической активностью. В триплетном состоянии он легко отрывает электрон от различных доноров с образованием радикалов. Это свойство позволяет использовать его в качестве фотохимического зонда для изучения состава и наноструктурной организации внеклеточного матрикса. Данные спектрально-флуоресцентные и фотохимические зонды были успешно применены нами для исследования стекловидного тела и жидкости передней камеры глаза, а также сыворотки крови у позвоночных.

Работа поддержана грантом фундаментальных исследований Президиума РАН.

Д6.5

**РЕЗОНАНСНОЕ СВЕТОРАССЕЯНИЕ (РСР) АГРЕГАТОВ
КРАСИТЕЛЕЙ: МЕРОЦИАНИН 540 (МЦ540)**

**Андрей ТИХОМИРОВ, Татьяна ШМИГОЛЬ,
Александр ПОТАПЕНКО**

Российский государственный медицинский университет, Москва, 117997, Россия
E-mail: amtikhomirov@list.ru; FAX: +7-495-246-71-75

МЦ540 – анионный краситель, применяемый как флуоресцентный зонд, а также сенсibilизатор в фотодинамической терапии. В чистой воде МЦ540 находится в форме димеров и мономеров с «водными» максимумами поглощения около 500 и 535 нм, соответственно. Добавление солей приводит к экранировке анионной группы МЦ540 катионами соли, уменьшению электростатического отталкивания, исчезновению водных максимумов и образованию агрегатов красителя с максимумом поглощения около 517 нм [Adenier & Aagon, *Spectrochim. Acta Part A*, 2002, **58**, 543-551].

В настоящей работе проведено квантовомеханическое моделирование спектров поглощения и РСР димеров и агрегатов МЦ540. При этом мономерная молекула МЦ540 рассматривается как система, описываемая гамильтонианом $\hat{H} = \hat{H}_0 + \hat{H}_1$, где \hat{H}_0 – часть гамильтониана, определяемая строением самой молекулы; \hat{H}_1 – часть, отвечающая за взаимодействие со светом. В первом приближении \hat{H}_1 может быть представлена в виде одномерного гармонического осциллятора. В квантовой теории поглощение света является процессом первого порядка, описываемым амплитудой перехода A_{12} , пропорциональной матричному элементу дипольного момента. Рассеяние света – процесс второго порядка, амплитуда перехода A_{11} через промежуточные состояния s соответствует поглощению света с последующим испусканием света той же частоты. Вероятность поглощения света на два порядка превосходит вероятность процесса рассеяния.

При агрегации мономеров (N мономеров) наибольший матричный элемент дипольного момента растет приблизительно $\sim N^{1/2}$, вероятность рассеяния $\sim N^2$, а концентрация уменьшается в N раз. Поэтому резонансное светорассеяние можно наблюдать при достаточно большом размере агрегатов.

Расчетные спектры поглощения и РСР агрегатов МЦ540 H -типа (димеров, тетрамеров и октамеров) сопоставлены с таковыми, измеренными в эксперименте.

Работа поддержана грантами РФФИ №04-04-49626а, 07-04-01060а.

**ВЛИЯНИЕ ИММЕРСИОННОГО ПРОСВЕТЛЕНИЯ
НА АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИЮ СКЛЕРЫ ЖИЖА****Елена В. МИГАЧЕВА, Александр Б. ПРАВДИН**

Саратовский Государственный Университет им. Н.Г. Чернышевского, 410012,
Астраханская 83, Саратов, Россия
E-mail: migachevaev@yandex.ru; Тел.: +7 (8452) 508971

Исследование спектров лазерно-индуцированной флуоресценции биологических тканей вызывает интерес в связи с разработкой в последние годы новых неинвазивных методов диагностики биотканей [1–3]. Однако, главным препятствием на пути к использованию данного метода является ограничение глубины проникновения возбуждающего излучения в биологические ткани, обусловленное их оптической микронеоднородностью, приводящей к высокому уровню светорассеяния в такой среде. Сильное рассеяние в ткани может оказывать влияние на форму регистрируемого спектра флуоресценции. Уменьшить рассеяние в оптически неоднородных тканях позволяет метод «оптического просветления» биотканей, основанный на концепции согласования показателей преломления рассеивающих центров и базового вещества при воздействии на ткань соответствующими химическими препаратами [4]. Известно также, что просветление тканей является обратимым процессом [5]. Одним из недавно предложенных механизмов уменьшения рассеяния света при оптическом просветлении является структурная модификация коллагена [6–8]. Необходимо отметить также, что основным флуорофором в соединительных тканях является коллаген. И здесь, возможно ожидать, что взаимодействие просветляющих агентов с коллагеновыми волокнами на молекулярном уровне может приводить к изменению интенсивности и формы спектра автофлуоресценции. Принимая во внимание все перечисленные выше факторы, которые могут существенно повлиять на интерпретацию полученных экспериментальных данных, наша задача состояла в наблюдении динамики и интенсивности спектров автофлуоресценции, регистрируемых с поверхности однородной (немногослойной) биоткани в условиях нанесения осмотических жидкостей при применении их с той же самой поверхности, с которой ведется наблюдение; а также в наблюдении тех же самых свойств автофлуоресценции при проведении регидратации просветленных образцов. В наших исследованиях, мы также применили обработку формалином, следуя работе [6], чтобы посмотреть, изменит ли обработка формалином предотвращение диссоциации, вызванной действием просветляющих агентов, и динамику спектров отражения и автофлуоресценции.

1. K. Koenig, H. Schneckenburger. Laser-induced autofluorescence for medical diagnosis // *Journal of Fluorescence*, 1994, Vol. 4, No. 1, 17–40.
2. I.J. Bigio, J.R. Mourant. Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy // *Phys. Med. Biol.*, 1997, Vol. 42, 803–814.
3. V.B. Loschenov, V.I. Konov, A.M. Prokhorov. Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnostic // *Laser Physics*, 2000, Vol. 10, No.6, 1188–1207.
4. В.В. Тучин. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. Изд. Сар. Унив., 1998, 384 с.
5. V.V. Tuchin. Optical clearing of tissues and blood using the immersion method // *Journal of Physics D: Applied Optics*, 2005, Vol. 38, 2497–2518.
6. A.T. Yeh, B. Choi, J.S. Nelson, B.J. Tromberg. Reversible dissociation of collagen in tissues // *Journal of Investigative Dermatology*, 2003, Vol. 121, 1332–1335.
7. A.T. Yeh, J. Hirshburg. Molecular Interactions of exogenous chemical agents with collagen-implications for tissue optical clearing // *Journal of Biomedical Optics*, 2006, V. 11, No 1.
8. J. Hirshburg, B. Choi, J.S. Nelson, A.T. Yeh. Collagen solubility correlates with skin optical clearing // *Journal of Biomedical Optics*, 2006, Vol. 11, No 4.

Д6.7

**ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ НАПРАВЛЕННОГО
ДЕЙСТВИЯ – КОНЬЮГАТЫ ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ
НАНОКРИСТАЛЛОВ И ПРОТИВОРАКОВЫХ МИНИ-АНТИТЕЛ**

**Татьяна ЗДОБНОВА^{1,2}, Эвелина ЭДЕЛЬВЕЙС¹, Сергей ДОРОФЕЕВ³,
Роман ВАСИЛЬЕВ³, Владимир ЗЛОМАНОВ³, Сергей ДЕЕВ¹**

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Россия
E-mail: liskaW@mail.ru; Тел.: (495) 330-63-92

²Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород, 603950,
Нижний Новгород, Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Новым классом флуорофоров, перспективным для использования в методах молекулярной диагностики являются полупроводниковые нанокристаллы (quantum dots, QDs). Целью данной работы было создание системы направленной доставки QDs к опухолевым клеткам для их последующей визуализации.

Для направленной доставки QDs были использованы мини-антитела (scFv) 4D5, способные с высокой эффективностью связываться с поверхностным онкомаркером HER2/неу. Для связывания QDs с мини-антителом 4D5 были использована разработанная нами ранее система молекулярных адапторов барназа-барстар. Один из компонентов полученной системы представляет собой рекомбинантный белок, состоящий из мини-антитела и барназы. Второй компонент системы – QDs, конъюгированные с барстаром.

Показано, что конъюгация QDs с барстаром значительно уменьшает уровень неспецифического связывания и позволяет без дальнейших модификаций присоединять нацеливающий модуль с барназой. После предварительной обработки клеток белком 4D5-барназа, конъюгаты QDs-барстар эффективно и с высокой специфичностью окрашивали поверхность HER2/неу-гиперэкспрессирующих клеток линий SKOV-3 и SKBR-3. Таким образом, разработана система, позволяющая с помощью флуоресцентных QDs визуализировать опухолевые клетки, экспрессирующие онкомаркер HER2/неу.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 07-04-015866 и программы президиума РАН «Фундаментальные науки - медицине».

ПРИМЕНЕНИЕ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОЙ ФОТОТЕРМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Георгий С. ТЕРЕНТЮК^{1,4}, Гариф Г. АКЧУРИН¹,
Ирина Л. МАКСИМОВА¹, Галина Н. МАСЛЯКОВА³,
Лейла В. СУЛЕЙМАНОВА³, Валерий В. ТУЧИН¹, Борис Н. ХЛЕБЦОВ²,
Николай Г. ХЛЕБЦОВ², Александр В. ШАНТРОХА¹

¹Саратовский государственный университет, Астраханская, 82, г. Саратов 410012
E-mail: vetklinika@front.ru; FAX: +7-8452-51-27-98

²Институт биохимии физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов

³Саратовский государственный медицинский университет, г. Саратов, Россия

⁴Первая ветеринарная клиника, г. Саратов, Россия

Для эффективной фототермической терапии злокачественных новообразований с помощью плазмонно-резонансных наночастиц необходимо согласовать длину волны лазерного излучения, максимум поглощения излучения золотыми наноструктурами и спектральную прозрачность биоткани для лазерных импульсов. Как известно, «оптическое окно прозрачности» биоткани соответствует ближней ИК области спектра и ограничено диапазоном 750–1100 нм. В работе экспериментально исследована на лабораторных животных *in vivo* динамика лазерного (808 нм) нагрева биоткани при различной глубине введения золотых наноболочек с кремниевым ядром, обладающих селективным поглощением на 810 нм. Для бесконтактного измерения температуры использовался тепловизор IRISYS 4010. Особое внимание уделено режимам воздействия, не приводящим к выраженному некрозу тканей, но вызывающим повышение температуры и другие изменения биоткани, которые могут стимулировать процессы апоптоза.

Проведено сопоставление возникающих в биоткани изменений, определяемых методами гистологического анализа с термограммами, измеренными на поверхности локальных участков биоткани *in vivo* непосредственно после лазерного воздействия. Методом атомно-абсорбционной спектроскопии экспериментально исследована динамика циркуляции золотых наночастиц в крови лабораторных животных при их внутривенном введении и их накопления в печени, почках и других органах.

Исследовано влияние наночастиц различного размера на функциональную активность тромбоцитов. Обнаружены изменения АДФ индуцированной агрегации тромбоцитов при добавлении наночастиц в образцы обогащенной тромбоцитами плазмы, обладающие размерно-обусловленной направленностью.

ДЕТЕКТИРОВАНИЕ ПЛАЗМОННО-РЕЗОНАНСНЫХ НАНОЧАСТИЦ НИЗКО-КОГЕРЕНТНЫМ И КОНФОКАЛЬНЫМ ОПТИЧЕСКИМ ТОМОГРАФОМ ДЛЯ ТЕХНОЛОГИИ ЛАЗЕРНОГО ФОТОТЕРМОЛИЗА

Гариф АКЧУРИН¹, Георгий АКЧУРИН¹, Борис ВЕКСЛЕР², Игорь КОЛБЕНЕВ³, Ирина МАКСИМОВА¹, Владимир МАКСИМОВ⁴, Игорь МЕГЛИНСКИЙ², Оксана НАУМОВА⁴, Александр СКАПЦОВ¹, Борис ХЛЕБЦОВ⁵, Николай ХЛЕБЦОВ^{1,5}

¹Саратовский госуниверситет, Саратов, 410012, Россия

E-mail: AkchurinGG@mail.ru; FAX: +7-845-22-785-29

²Cranfield University, Cranfield, England, UK

³Саратовский медицинский госуниверситет, Саратов, 410012, Россия

⁴Областная офтальмологическая больница, Саратов, 410051, Россия

⁵ИБФРМ РАН, Саратов, 410049, Россия

В последнее время интенсивно исследуется новый метод селективной инактивации клеток – ИК лазерная фототермия раковых клеток на основе золотых плазмонно-резонансных наночастиц [1]. В отличие от фотодинамической терапии опухолей потенциально эта технология должна позволить достичь большей селективности разрушения патологических клеток за счет функционализации наночастиц биоспецифическими молекулами, обеспечивающих адресную их доставку к опухолевым клеткам. Одна из проблем - оценка концентрации наночастиц в тканях при локальном введении и обнаружение в биотканях при их внутривенном введении. Наиболее чувствительным и достоверным оказался абсорбционный метод при зондировании УФ излучением лампы с полым катодом на парах золота, однако биоткань должна пройти технологию озонирования.

Неинвазивная “оптическая гистология” биотканей и фантомов из агара с наночастицами осуществлялась с помощью низко-когерентного оптического томографа (ОСТ) фирмы “Carl Zeiss” с длиной волны 820 нм, а также на длине волны 1.3 мкм. В агаре глубина зондирования достигала 2 мм, а в биотканях типа эпидермиса кожи и слизистых достигала 300–500 микрон при концентрации нанооболочек 10^9 /мл. Использование Гейдельбергского конфокального лазерного томографа (НРТ) позволяет повысить пространственное разрешение до единиц кубических микрон в прозрачных биотканях. Детектирование плазмонно-резонансных золотых нанооболочек проводились для слоистых фантомов агара. Исследование динамики проникновения нанооболочек Au/SiO₂ (30/140) через кожу пальца позволили обнаружить движение по потовым канальцам эпидермиса.

**GELATIN FILMS BASED ON BACTERIORHODOPSIN
AND SOME ITS ANALOGS AND THEIR ISOTROPIC
AND ANISOTROPIC PROPERTIES**

**Anna DRUZHKO¹, Nikolai BURYKIN², Dmitriy STEPANCHIKOV³,
Elena KORCHEMSKAYA²**

¹Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, Russia 142290
E-mail: druzhko@iteb.ru

²Institute of Applied Optics, National Academy of Sciences, Kiev, Ukraine

³Zhitomir State University, Zhitomir, Ukraine

⁴Institute of Physics, National Academy of Sciences, Kiev, Ukraine

Bacteriorhodopsin (BR), the photochromic protein from purple membrane of *Halobacterium salinarium*, holds considerably promise as a biological material for a variety of technological applications because of its light sensitivity, photoelectric activity and nonlinear optical properties.

Photoisotropic and photoanisotropic properties of gelatin films made with some bacteriorhodopsin derivatives have been presented in order to illustrate the potential of such samples for different application. The dynamic holography recording on gelatin films made with 14-fluoro bacteriorhodopsin, wild type as well as D96N mutant, has been performed using photochromic (isotropic) properties of these BR derivatives. Low- intensity red light from cw He-Ne laser is applied for dynamic holography recording. Pre-illumination with blue light of these samples significantly increases the diffraction efficiency of both 14-F wild type and 14-F D96N BR samples. A character of a possible blue-shifted photoproduct is discussed. The sequential application of blue and red laser beam indicates that isotropic properties of 14-F BR gelatin films might be successfully applied for holographic storage and associative memories.

On the other hand it was shown that gelatin films based on native BR and its derivatives 4-keto BR exhibit a nonlinear photoinduced anisotropy. Characteristics of nonlinear photoinduced anisotropy of these samples form the foundation to a model of anisotropic photoselection of pigment's molecules under linearly polarized light. The data are presented showing the correlation between the laser induced anisotropic properties and chromophore/protein interaction. The anisotropic properties of 4-keto BR derivatives allows to demonstrate the importance of photoinduced dichroism method to estimate the rigidity of the chromophore bounding with protein and to extend the range of application of such systems in a real-time optical processing.

Д6.11

**ФЕМТОСЕКУНДНЫЙ МАНИПУЛЯТОР-СКАЛЬПЕЛЬ
И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

Олег М. САРКИСОВ

Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН

**РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОДХОДОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ
ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ ДЕПРЕССИЙ НА ОСНОВЕ
ПИКОСЕКУНДНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ
БЕЛКОВ (СТАТУС РАБОТ ПО ПРОЕКТУ)**

**Ю.А. ГРЫЗУНОВ², А.А. КОМАР¹, Т.И. СЫРЕЙЩИКОВА¹,
Н.В. СМОЛИНА², Г.Е. ДОБРЕЦОВ², Э.Ю. МИСИОНЖНИК³,
Н.М. МАКСИМОВА³, УЗБЕКОВ М.Г.³**

¹ФИАН им. П.Н.Лебедева РФ

²ФГУ НИИ физико-химической медицины Росздрава

³ФГУ МНИИ психиатрии Росздрава

Депрессия является одним из наиболее социально значимых заболеваний в мире. Особую актуальность имеет ранняя оценка эффективности проводимой терапии при выявленном заболевании. Ранее методами регистрации стационарной флуоресценции нами было показано конформационные изменения главного внеклеточного транспортного белка человека – альбумина. Однако стационарные показатели не дают детальной картины изменений альбумина, и не позволяют оценить эффективность проводимой терапии на ранних стадиях лечения. Для решения поставленной задачи требуется применение специальной техники субнаносекундных измерений затухания флуоресценции. Поэтому на первом этапе выполнения Проекта в ФИАН им. П.Н. Лебедева была применена лазерная установка для проведения флуоресцентных измерений в этом временном диапазоне.

Для изучения изменений альбумина был выбран оригинальный флуоресцентный зонд – производное диметиламинафталевой кислоты (K35), который позволяет изучать альбумин без его выделения из сыворотки. На втором этапе Проекта для понимания механизмов возникновения флуоресценции зонда из альбумина методом *ab initio* были проведены квантово-механические расчеты его конформации и рассчитаны энергии взаимодействия со средами, моделирующими свойства альбуминовых центров. По результатам экспериментов на изолированном белке была построена модель взаимодействия зонда с альбумином.

Также было начато комплексное (биофизическое, биохимическое, нейрорхимическое, гормональное) клиническое исследование альбумина больных депрессивным эпизодом (F32.1) и рекуррентным депрессивным расстройством (F33.1) – в сравнении с группой здоровых добровольцев. Показано, что альбумин больных депрессией характеризуется уменьшением взаимодействия зонда с гидрофобным карманом и усилением взаимодействия с поверхностными центрами. Параметры затухания флуоресценции зонда позволили выявить влияние психофармакотерапии уже на второй неделе лечения. Идет дальнейшее накопление клинических, лабораторных и биофизических данных.

Д6.13

ГОЛОГРАФИЧЕСКИЕ ДАТЧИКИ НА ОСНОВЕ ГИДРОГЕЛЕЙ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

**А.В. КРАЙСКИЙ¹, В.А. ПОСТНИКОВ², В.В. ДЕНИСКИН³,
Т.Т. СУЛТАНОВ⁴, В.Е. ТИХОНОВ⁴, А.В. ХАМИДУЛИН²**

¹Физический институт им. П.Н.Лебедева РАН, Москва

²Федеральное государственное учреждение «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины», Росздора, Москва
E-mail: vladpostnikov@mail.ru

³Федеральное государственное предприятие «Научно-исследовательский институт физических проблем» им. Ф.В. Лукина, Зеленоград

⁴Институт элементоорганических соединений им. А.Н.Несмеянова РАН, Москва

Рассматриваются свойства 2 типов голографических сенсоров на основе тех же мономеров, что применялись авторами работ [1], но с другой конструкцией сетки и другим способом прикрепления ее к подложке и измененной технологией получения зерен галоидного серебра. Матрицы представляли собой трехмерную полимерную сетку сополимера акриламида с акриловой кислотой, N-акрилоиламидофенилборной кислотой, сшитые N,N'-метилен-бис-акриламидом, содержащие включенный поливиниловый спирт. Сенсоры на основе акриловой кислоты чувствительны к кислотности среды и содержанию ионов двухвалентных металлов. В диапазоне изменения pH от 6.7 до 2 смещение максимума отражения составляет от 725 нм до 550 нм с хорошей линейной аппроксимацией в диапазоне значений pH 3.2–6.7. Из ионов двухвалентных металлов (Mn, Ca, Pb) максимальное сжатие дает свинец (542нм, сжатие на 37 %). При этом максимум отражения смещен относительно дистиллированной воды на 320 нм. Для сенсора на основе N-акрилоиламидофенилборной кислоты в пределах физиологических концентраций глюкозы получено уверенное приборное различие по спектру (607–643 нм) для концентраций 1, 5, 10, 50 ммоль/л в ацетатном буфере (0,05M, 0,15 M NaCl) pH 7,4 с хорошей линейной аппроксимацией в диапазоне концентраций 1–10 ммоль/л. При использовании буферных растворов на основе многоосновных кислот, положение максимума спектра отражения этой системы изменялось от 590 до 860 нм.

1. Marshall A.J. et al., 2006, Analyte-responsive holograms for (bio)chemical analysis, *J.Phys.Condens.Matter.*, **18**, S619-626 и патент США №5989923 от 23.11.1999.

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЕ БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ ПЛАЗМОННЫХ НАНОСТРУКТУР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ БИОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ**А.В. НАШЕКИН¹, К.К. ТУРОВЕРОВ², О.А. УСОВ¹,
П.Н. БРУНКОВ¹, А.И. СИДОРОВ³**

¹Физико-технический институт им. А.Ф.Иоффе РАН, Санкт-Петербург, 194021
E-mail: nashchekin@mail.ioffe.ru; FAX: (812) 297-10-17

²Институт цитологии РАН, С.-Петербург, Санкт-Петербург, 194064

³Государственный Оптический Институт им. С.И. Вавилова, С.-Петербург 199034

Создание оптических биосенсоров (БС) с высокой чувствительностью и разрешением для обнаружения и количественного анализа химических и биологически активных веществ одна из актуальных задач современной науки, связанная с необходимостью контроля биологических процессов, анализа эффективности лекарственных средств и мониторинга окружающей среды. Наряду с традиционными БС, использующими характеристические спектральные полосы макромолекул, наночастиц металлов и наноструктур значительное внимание уделяется разработке рефрактометрических БС, основанных на резонансных и интерференционных явлениях в фотонных и плазмонных наноструктурах [1]. Особый интерес вызывают БС, обладающие поверхностным плазмонным резонансом, при котором концентрация и параметры процессов в биообъектах определяются из анализа изменений показателя преломления в поле электромагнитной волны под влиянием процессов в этих объектах.

В рамках проводимой работы использованы два различных технологических подхода для получения плазмонных наноструктур: создание на поверхности диэлектриков упорядоченных массивов наночастиц (Cr, Au, Ag, Ni) и формирование массивов металлических наночастиц в приповерхностных слоях термохромных стекол. При контакте с биообъектами (вирусы, антитела, ДНК) [2] плазмонные наноструктуры позволяют также более чем на порядок увеличить интенсивность сигналов флуоресценции, т.е. расширяют возможности обнаружения, идентификации и диагностики биологических объектов [3].

Работа поддержана грантом Президиума РАН-10155 (25.03.2008) "Фундаментальные науки-медицине" и грантом Президента РФ НШ-2951.2008.2.

1. J. Homola. Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species. Chem. Rev. 108, pp. 462–493 (2008).

2. P.P. Pompa et al. Metall-enhanced fluorescence of colloidal nanocrystals with nanoscale control. Nature Nanotechnology, vol. 1, pp. 128–130 (2006).

3. M.G. Friedrich et al. Activity of Membrane Proteins Immobilized on Surfaces as a Function of Packing Density. J.Phys. Chem. B. 112, pp. 3193–3201 (2008).

Д6.15

**СПЕКТРАЛЬНО-КИНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ
КОМПЛЕКСОВ КРАСИТЕЛЕЙ С БИОМАКРОМОЛЕКУЛАМИ**

**В.А. КУЗЬМИН, Н.Н. ВЕЙКО, О.А. РОГИНКО, О.А. КОЗДОБА,
Т.Д. НЕКИПЕЛОВА, А.М. ВИНОГРАДОВ, В.В. ВОЛНУХИН,
А.Л. ЖУЗЕ, А.А. ЮДИН, А.И. СПЕРАНСКИЙ**

Институт биохимической физики им. Н.Н. Эмануэля РАН, Москва, 119334, Россия
E-mail: vak@sky.chph.ras.ru; FAX: +7-495-137-4101

При диагностике заболеваний органов кровообращения, аутоиммунных и онкологических заболеваний используются флуоресцентные методы для определения экстрацеллюлярной ДНК в сыворотке крови больных. Появление ДНК в сыворотке свидетельствует о раннем поражении ткани и отражает степень повреждения органа при некротическом процессе. Спектрально-флуоресцентный метод определения внеклеточной ДНК разрабатывается с использованием новых бискрасителей, сочетающих различные молекулярные фрагменты. Предложены новые производные несимметричных карбоцианинов, у которых образование комплексов с ДНК происходит при связывании в узкой бороздке и при интеркалировании между основаниями. Деактивация возбужденных синглетных и триплетных состояний комплексов цианиновых красителей с молекулами ДНК исследована на установках импульсного фотолитола и счета фотонов с лазерным фотовозбуждением. Наличие двух положительных зарядов у бисцианинов усиливает комплексообразование между сенсбилизатором и отрицательно-заряженной поверхностью молекулы ДНК, а присутствие в молекуле гидрофобного фрагмента приводит к увеличению флуоресценции этих комплексов, что позволяет увеличить чувствительность флуоресцентного анализа фрагментов внДНК. С целью определения абсолютных концентраций ДНК в сыворотках флуоресцентным методом использован перенос энергии между комплексами красителей, образованными внутри одной молекулы ДНК. Определение концентрации ДНК в присутствии примесей белков возможно с использованием процесса образования J-агрегатов бискрасителей на поверхности ДНК. Предложен новый способ оценки уровня гибели клеток в организме человека при острых и хронических патологических процессах, которые сопровождаются усиленным апоптозом и некрозом клеток. Показано, что при остром инфаркте миокарда в крови в среднем в 5 раз по сравнению с нормой возрастает концентрация внДНК и в 12 раз – концентрация ТОрДНК. Фрагменты ТОрДНК могут быть маркерами скрытого увеличения уровня гибели клеток при патологии и выступать в роли факторов стресс-сигнализации при ответе организма на увеличение уровня гибели клеток.

Д6.16

**СТАБИЛЬНАЯ ЛИНИЯ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ
ЯИЧНИКА ЧЕЛОВЕКА, ФЛУОРЕСЦИРУЮЩАЯ
В ДАЛЬНОЙ КРАСНОЙ ОБЛАСТИ**

**Д.В. КАРПЕНКО, О.А. СТРЕМОВСКИЙ, Е.Н. ЛЕБЕДЕНКО,
Д.М. ЧУДАКОВ, С.А. ЛУКЪЯНОВ, С.М. ДЕЕВ**

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Россия
E-mail: dejev@ibch.ru; Тел. (495)429-88-10

При работе с опухолевыми моделями *in vivo* и *in situ* чрезвычайно важно иметь объективные методы наблюдения и контроля за опухолевыми клетками.

На основе клеток аденокарциномы яичника человека SKOV3 была создана линия клеток, флуоресцирующая в дальней красной области и гиперэкспрессирующая онкомаркер HER2/neu. Для этого линия клеток SKOV3 была трансфицирована плазмидой, несущей ген, кодирующий GFP-подобный флуоресцентный белок *katushka*. После отбора на селективной среде были получены стабильные трансформанты, сохраняющие флуоресценцию при длительном культивировании на неселективной среде, а также при выведении из заморозки. При помощи тест системы разработанной в нашей лаборатории было доказано сохранение гиперэкспрессии HER2/neu рецептора на поверхности трансфицированных клеток.

Белок *katushka* имеет максимум флуоресценции при 635 нм, и максимум поглощения при 588 нм. Такие характеристики флуоресценции позволяют не только непосредственно наблюдать за клетками с помощью флуоресцентной и конфокальной микроскопии, но и визуализировать привитые опухоли в тканях живого организма при помощи флуоресцентной томографии.

Д6.17

ПРИЖИЗНЕННАЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ОПУХОЛЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ НАНОКРИСТАЛЛОВ

**Ирина БАЛАЛАЕВА^{1,2}, Анна БРИЛКИНА^{1,2}, Марина ШИРМАНОВА^{1,3},
Татьяна ЗДОБНОВА^{2,4}, Эвелина ЭДЕЛЬВЕЙС⁴, Марина СИРОТКИНА³,
Олег СТРЕМОВСКИЙ⁴, Сергей ДЕЕВ⁴, Анна ОРЛОВА²**

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
Нижегород, 603950, Россия
E-mail: irin-b@mail.ru; Тел: +7-831-465-61-06

²Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород, 603950,
Нижний Новгород, Россия

³Нижегородская государственная медицинская академия,
пл. Минина и Пожарского, 10/1, Нижний Новгород, 603005, Россия

⁴Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997, Россия

В работе оценены возможности прижизненного маркирования экспериментальных опухолей полупроводниковыми нанокристаллами и их последующей визуализации с помощью оптических методов.

Моделью неоплазии служили карцинома легкого Льюис, и ксенографты карциномы груди человека SKBR-3. Оценены возможности пассивного мечения опухолей и специфическая доставка нанокристаллов. Для направленной доставки были использованы мини-антитела (scFv) 4D5, взаимодействующие с онкомаркером HER2/neu. Прижизненная визуализация опухолей проводилась на установке для диффузионной флуоресцентной томографии (ДФТ). Оценка распределения нанокристаллов в организме животного post mortem проводилась методами спектроскопии и конфокальной микроскопии.

Получены прижизненные флуоресцентные изображения животных-опухоленосителей, позволяющие продемонстрировать возможность визуализации опухолей при разных подходах к их маркированию. Показано органное распределение нанокристаллов через разное время после их введения. Продемонстрировано преимущество адресной доставки нанокристаллов по сравнению с попытками «пассивного» мечения.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (№07-04-01586, 07-02-01146, 08-02-99049), программы президиума РАН «Фундаментальные науки - медицине» и проекта Федерального Агентства по Науке и Инновациям (проект № 02.522.11.2002).

РАЗНОМАСШТАБНЫЙ ОПТИЧЕСКИЙ БИОИМИДЖИНГ

**Наталья ШАХОВА¹, Ирина БАЛАЛАЕВА³, Валентин ГЕЛИКОНОВ¹,
Григорий ГЕЛИКОНОВ¹, Елена ЗАГАЙНОВА², Владислав КАМЕНСКИЙ¹,
Анна ОРЛОВА¹, Екатерина СЕРГЕЕВА¹, Илья ТУРЧИН¹**

¹Институт прикладной физики РАН, 603950, ул. Ульянова, д. 46,
Нижний Новгород, Россия

E-mail: shahk@ufp.appl.sci-nnov.ru; Тел: +7-831-416-48-04

²Нижегородская государственная медицинская академия, пл. Минина
и Пожарского, 10/1, Нижний Новгород, 603005, Россия

³Нижегородский государственный университет, пр. Гагарина, 23,
Нижний Новгород, 603950, Россия

Основные требования, предъявляемые к диагностическим технологиям в биомедицине, - максимальная информативность и минимальное повреждающее действие в сочетании с портативностью, удобством эксплуатации и относительной дешевизной. Данным требованиям в наибольшей степени удовлетворяют методы оптического биоимиджинга [1]. В работе представлен спектр исследований, проводимых в ИПФ РАН (г. Н. Новгород), по реализации системы разномасштабного оптического биоимиджинга: разработка новых видов оптической томографии (оптическая когерентная томография – ОКТ, оптическая диффузионная томография – ОДТ, диффузионная флуоресцентная томография – ДФТ), пути усовершенствования принципов и приборной базы технологий. Освоение совокупности технологий оптического биоимиджинга позволяет получать разномасштабные прижизненные изображения биологических объектов на тканевом, клеточном и субклеточном уровнях, что весьма актуально как для изучения живых систем от молекулы до целого организма в науках о жизни, так и для создания новых методов диагностики и контроля лечения в клинической практике [2–4].

Работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН “Фундаментальные науки-медицине”, грантов РФФИ № 07-02-01262, 07-04-01586 и Федерального агентства по науке и инновациям (№ 02.522.11.2002).

1. A.M.Sergeev, L.S.Dolin, D.H.Reitze, Optics & Photonics News. July (2001)

2. Ilya V. Turchin et al Laser Physics, 16, N 5, (2006)

3. A.G. Orlova et al Laser Physics Letters, Vol.5, No 4, pp.321–335 (2008)

4. Руководство по оптической когерентной томографии. Под ред. Н.Д. Гладковой, Н.М. Шаховой, А.М. Сергеева: Физматлит. Медкнига, (2007)

Д6.19

ПРИЖИЗНЕННЫЙ МОНИТОРИНГ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕЙ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ МЕТОДАМИ ДФТ И ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

**Ирина МЕЕРОВИЧ¹, Ляйсан АРСЛАНБАЕВА¹, Илья ТУРЧИН²,
Анна ОРЛОВА², Марина ШИРМАНОВА², Александр САВИЦКИЙ¹**

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

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

²Институт прикладной физики, Нижний Новгород, 603950, Россия

Использование флуоресцирующих белков (ФБ) в качестве прижизненных маркеров позволяет вести непрерывный визуальный мониторинг процессов, происходящих в живых организмах на молекулярном и клеточном уровнях [1], в том числе развития опухолей у животных [2]. Применение ФБ со спектром излучения в красно-оранжевой области позволяет увеличивать глубину визуализации сигнала из-за уменьшения автофлуоресценции и светорассеяния [2].

Суспензия клеток Mel-Kog, экспрессирующих ФБ Turbo-RFP (Mel-Kog-Turbo-RFP), вводилась подкожно мышам линии Nu/Nu (самки, возраст 8–12 недель), в количестве 400 тысяч до 8,5 млн. В ходе эксперимента контролировался объем опухолевых узлов.

Показано, что введение не менее 2 млн клеток Mel-Kog-Turbo-RFP приводит к развитию опухоли. Флуоресценция клеток в области введения, а также в опухолевом очаге регистрировалась прижизненно методами диффузионной флуоресцентной томографии (ДФТ) при помощи томографа ДФТ-3 (ИПФ РАН) и флуоресцентной спектроскопии при помощи спектрофлуориметра “Спектр-Кластер” в течение всего времени развития опухоли. Рост всех опухолей характеризовался интенсивной неоваскуляризацией.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что клетки Mel-Kog-Turbo-RFP *in vivo* сохраняют как способность образовывать опухоль, так и способность в течение длительного времени экспрессировать красный ФБ. При помощи ДФТ можно проследить динамику развития опухоли.

Работа частично финансировалась в рамках госконтракта № 02.522.11.2002 от 27.04.07, а также из средств Программ Президиума РАН “Фундаментальные науки - медицине” и “Молекулярная и клеточная биология”.

1. J.C.March, G.Rao, W.E.Bentley. // Appl. Microbiol. Biotech. 2003, V. 62, pp. 303–315

2. R.-M. Hoffman // Trends in Biotechnology. 2008, V. 26, pp. 1–3.

ИССЛЕДОВАНИЕ КИСЛОРОДНОГО СТАТУСА ТКАНЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЕТОДОМ ОПТИЧЕСКОЙ ДИФФУЗИОННОЙ ТОМОГРАФИИ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

**Анна ОРЛОВА¹, Владислав КАМЕНСКИЙ¹, Анна МАСЛЕННИКОВА²,
Владимир ПЛЕХАНОВ¹, Герман ГОЛУБЯТНОКОВ¹, Наталия ШАХОВА¹,
Михаил КЛЕШНИН¹, Илья ТУРЧИН¹**

¹Институт прикладной физики РАН, 603950, ул. Ульянова, д. 46,
Нижний Новгород, Россия
E-mail: orlova@ufp.appl.sci-nnov.ru; Тел: +7-831-416-48-04

²Нижегородская государственная медицинская академия,
пл. Минина и Пожарского, 10/1, Нижний Новгород, 603005, Россия

Исследование методом оптической диффузионной томографии (ОДТ) основано на различиях в оптических свойствах (показателей рассеяния и поглощения) здоровых и патологических участков тканей, расположенных глубоко под поверхностью [1]. С использованием ОДТ установки, разработанной в ИПФ РАН (Нижний Новгород) [2], проведены *in vivo* исследования ткани молочной железы в норме и в зоне опухоли. Получены карты распределения поглощающих и рассеивающих включений на трех длинах волн, а так же карты распределения окси-(HbO₂), дезоксигемоглобина (Hb) и насыщения крови кислородом (StO₂). Выявлено, что ткань молочной железы в норме характеризуется равномерным распределением концентраций Hb, HbO₂ и постоянным уровнем StO₂. Для зоны опухоли характерно повышенное содержание суммарного гемоглобина. При этом распределение Hb, HbO₂ и StO₂ в одной и той же опухоли неравномерно и позволяет выделять участки с различной оксигенацией.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (№ 08-02-01042) и Федерального Агентства по Науке и Инновациям (№ 02.522.11.2002).

1. Pogue B.W., McBride T.O., Osterberg U.L., Paulsen K.D., *Optics Express*, 1999, 4(8), 270–286.

2. Orlova A.G., Turchin I.V., Plehanov V.I., Shakhova N.M., Fiks I.I., Kleshnin M.I., Sergeeva E.A., Konuchenko N.Yu., and Kamensky V.A., *Frequency-domain diffuse optical tomography with single source-detector pair for breast cancer detection*, *Laser Physics Letters*, 2008, 5(4), 321–327.

Д6.21

НОВЫЕ МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОГО БИОИМИДЖИНГА В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

**К.В. АНОХИН, А.А. ЛАЗУТКИН, О.И. ЕФИМОВА,
Д.В. БЕЗРЯДНОВ, С.А. ЧЕХОВ**

Институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН, Москва,
125009, Россия
E-mail: k.anokhin@gmail.com; Tel/Fax: 495-6012126

В современных биомедицинских исследованиях нормальных и нарушенных функций генов чрезвычайно актуальной является задача визуализации их активности в цельных органах и тканях организма. Особенно остро эта задача стоит в отношении центральной нервной системы млекопитающих, в сотнях структур которой активны более 80 % генов генома. В настоящий момент существует ограниченное число методов трехмерной визуализации распределения молекулярных маркеров в биологической ткани. Среди них наиболее распространенными являются конфокальная и мультифотонная микроскопия. Данные методы обладают высоким пространственным разрешением (порядка 0.5–1 мкм), однако имеют существенные ограничения по толщине исследуемого образца и величине поля зрения. Так, конфокальная микроскопия позволяет реконструировать с клеточным разрешением толщину ткани порядка 200–300 мкм, мультифотонная – до 1,0 мм, одномоментная область визуализации – от 0,1–0,5 мм до 2,0 мм. Метод оптической проекционной томографии (ОПТ) основан не на сборе «виртуальных срезов», как в конфокальной и мультифотонной микроскопии, а на создании «оптических проекций», получаемых в процессе последовательной съемки образца целиком под разными углами, путем вращения его на 360 градусов в плоскости, перпендикулярной оптической оси снимающего устройства. Полученные серии изображений реконструируются в единый трехмерный объем по алгоритму обратных проекций. Данный метод обладает разрешающей способностью в пределах 15–20 мкм и позволяет исследовать экспрессию генов и морфологию в цельных образцах ткани размером до 15 мм, средствами светлопольной и флуоресцентной микроскопии. Ультрамикроскопия, или микроскопия с освещением в избирательной плоскости (Selective Plane Illumination Microscopy – SPIM) также требует окрашивания исследуемых образцов целиком, и подходит для оптически высокопрозрачных образцов. В современных модификациях этого метода заложен принцип получения виртуальных оптических срезов прозрачного образца путем освещения его плоским пучком света в избирательной плоскости, находящейся в зоне фокуса. В качестве освещения используется тонко сфокусированный плоский пучок лазера. Мы разработали новый вариант метода молекулярной оптической томографии, который имеет в своей основе принципы ультрамикроскопии и опирается на оригинальные протоколы иммуногистохимического окрашивания и просветления фиксированной ткани мозга. В отличие от конфокальной и мультифотонной микроскопии, разработанный метод имеет поле зрения до 20 мм без потери клеточного разрешения и позволяет проводить трехмерную визуализацию локализации молекулярных маркеров и флуоресцентных белков в крупных образцах нервной ткани. В докладе будут представлены примеры первых результатов использования данного метода.

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ УЛЬТРАМИКРОСКОПИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОСВЕТЛЕННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ

Андрей МОРОЗОВ¹, Илья ТУРЧИН¹, Владислав КАМЕНСКИЙ¹, Константин АНОХИН²

¹Институт прикладной физики РАН, Ульянова 46, Нижний Новгород, 603950

E-mail: morozov@ufr.appl.sci-nnov.ru; Тел: +7-831-416-49-23

²Институт Нормальной Физиологии РАМН, Москва, Россия

Метод флуоресцентной ультрамикроскопии, получивший активное развитие в последние 2 года [1], используется для визуализации внутренней структуры просветленных биологических тканей, окрашенных специфическими флуоресцентными маркерами (ИГХ, флуоресцентные белки). В отличие от конфокальной микроскопии, в данном методе подсветка образца осуществляется с боку плоским лучом, что позволяет достичь существенно более высокого продольного контраста на всех глубинах исследования объекта. Разработанная нами конструкция имеет отличительную особенность от публиковавшихся ранее аналогов – использование в качестве световедущего тракта одномодового волоконного-оптического световода. Использование волоконных элементов позволило улучшить пространственное разрешение за счет фильтрующих свойств одномодовых волокон, создать более компактный прибор, удобный в эксплуатации. Двусторонняя система планарной лазерной подсветки на длине волны 488 нм с последующим анализом стимулированной флуоресценции высокоапертурным микроскопом с ПЗС камерой, позволили одновременно добиться высокого пространственного разрешения (около 1 мкм) по всем трем координатам и большой площади визуализации. Автоматизированная система сканирования вглубь образца позволяет послойно исследовать образцы размером до 30 x 15 x 15 мм. с шагом до 1 мкм и последующей компьютерной обработкой и 3х-мерной визуализацией. Экспериментально разработанный протокол просветления образцов нервной ткани позволил существенно уменьшить коэффициент поглощения и, следовательно, увеличить глубину визуализации образца, по сравнению с зарубежными аналогами, без потери разрешения. На созданной системе флуоресцентной ультрамикроскопии были получены 2D и 3D изображения отдельных нейронов и нейронных сетей различных отделов мозга мыши.

Работа выполнена при поддержке проекта Федерального Агентства по Науке и Инновациям (Г.К. № 02.522.11.2002).

1. Dodt, H.-U. et al. "Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain". *Nature Methods*, 4: 331–336, 2007.

Д6.23

КОНФОКАЛЬНАЯ И ОПТИЧЕСКАЯ КОГЕРЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛОВ ВОЗБУЖДЕНИЯ У РАСТЕНИЙ

**Владимир ВОДЕНЕЕВ¹, Елена АКИНЧИЦ¹, Ирина БАЛАЛАЕВА^{1,2},
Роман МАМОНОВ¹, Анна ОРЛОВА²**

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского,
Нижний Новгород, 603950, Россия

E-mail: kbf@bio.unn.ru; Тел: +7-831-465-43-90

²Институт прикладной физики РАН, 603950, ул. Ульянова, д. 46, Нижний Новгород,
Россия

Несмотря на то, что феномен возбуждения у высших растений установлен достаточно давно и изучена роль потенциалов возбуждения – потенциала действия (ПД) и переменного потенциала (ВП) – в качестве индукторов адаптивного ответа растений на действие неблагоприятных факторов, механизмы генерации ПД и ВП остаются малоизученными. Сложная структура проводящих тканей накладывает ограничения на использование классических электрофизиологических методов. Применение современных оптических методов позволяет регистрировать изменения внутренней структуры и динамику ионных концентраций на интактных растениях.

Для оценки возможности непосредственного участия H^+ -АТФазы плазматических мембран в генерации ПД определяли изменения внеклеточного рН с помощью зонда FITC-dextran с одновременной записью электрической активности. Изображения внутренней структуры, спектры флуоресценции и динамика ее интенсивности были зарегистрированы на интактных растениях с применением конфокальной микроскопии. Полученные результаты указывают на участие H^+ -АТФазы в формировании ПД, индуцированного локальным охлаждением.

Для визуализации структур, принимающих участие в распространении ВП, возникающего в ответ на повреждающие воздействия, использовался метод оптической когерентной микроскопии (ОКМ). На ОКМ-изображениях четко визуализируются внутренние структуры растения. Показана возможность регистрации их возможных изменений при генерации и распространении ВП.

Работы выполнены при частичной поддержке Программы фундаментальных исследований президиума РАН “Фемтосекундная оптика и новые оптические материалы”.

Д6.24

ЛАЗЕР-ИНДУЦИРОВАННАЯ АУТОФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ПРЕДРАКА И РАННЕГО РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

**Н.Н. БУЛГАКОВА¹, Е.Г. НОВИКОВА², И.А. АПОЛИХИНА³,
О.И. ТРУШИНА², Е. Д. ДЕНИСОВА³, О.С. БАЛАХОНЦЕВА²,
К.А. ВЕРЕЩАГИН¹, В.В. СМИРНОВ¹**

¹ИОФ им. А.М. Прохорова РАН

²ФГУ «МНИОИ им. П.А. Герцена Росмедтехнологий»

³ФГУ «НЦАГиП им. В.И.Кулакова Росмедтехнологий», 119991 Москва,

ул. Вавилова, 38,

E-mail: koker@kapella.gpi.ru, тел/факс+7(499)1350297

На протяжении последних лет наблюдается тревожная тенденция роста заболеваемости раком шейки матки среди молодых женщин моложе 29 лет, т.е. в репродуктивно значимой части населения. В этой связи актуальной проблемой является разработка новых методов ранней диагностики рака шейки матки, поскольку ранняя диагностика позволяет проводить органосохраняющее лечение. К числу таких методов относятся флуоресцентные методы, которые позволяют выявлять злокачественные поражения по индуцированной световым излучением характерной флуоресценции эндогенных или экзогенных флуорофоров биологических тканей.

Основной целью нашего исследования была разработка методики аутофлуоресцентной диагностики предопухолевого патологического процесса шейки матки *in vivo*. В качестве метода исследования применяли метод локальной флуоресцентной спектроскопии при возбуждении флуоресценции в трех спектральных областях (405 нм, 532 нм и 638 нм). Измерения спектров нормального и дисплазированного эпителия проводили *in vivo* на спектрально-флуоресцентной диагностической установке «Спектр-Кластер» в спектральном диапазоне 420–800 нм с помощью специально разработанного волоконно-оптического зонда. В исследовании участвовало 20 пациенток (средний возраст 31 год) с ЦИН1-2 (n=6), ЦИН2-3 и CIS (n=12). Показано, что при возбуждении в 638 нм аутофлуоресценция указанных тканей практически отсутствует. При возбуждении в 405 нм и 532 нм регистрируются воспроизводимые спектры аутофлуоресценции, причем статистически достоверные различия в спектрах аутофлуоресценции нормального и патологического эпителия (ЦИН2-3, включая CIS) регистрируются *in vivo* только при возбуждении в 408 нм.

Проведено исследование и оценка различных алгоритмов расчетов спектральных признаков, которые могут иметь прогностическое значение в оценке процесса развития предопухолевого трансформации эпителия шейки матки.

ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МОДИФИЦИРОВАННЫХ БИОМАТРИЦ**Ольга ДЯЧУК, Анна ТКАЧЕНКО**

Саратовский государственный технический университет, ул. Политехническая, 77,
г. Саратов, 410054, Россия
E-mail: djachuko@mail.ru

Известно, что при биофизических исследованиях локального окружения молекул в растворах мицеллообразующих поверхностно-активных веществ (ПАВ), а также структур различных биологических мембран широко используются флуоресцирующие органические соединения в качестве молекулярно-микроскопических зондов.

В нашей работе посредством люминесцентного зонда пирена мы исследовали физико-химические свойства модифицированных поверхностно-активными веществами образцов целлюлозы, применяемой в качестве твердой биоматрицы для люминесцентных исследований. Модифицирование проводили с целью повышения эффективности сорбционного концентрирования гидрофобных соединений полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) данной матрицей. Это позволило значительно улучшить аналитические характеристики люминесцентного определения ПАУ в водных средах.

В работе использовались такие характеристики люминесцентного зонда пирена как интенсивность максимумов флуоресценции и индекс полярности, определяемый отношением интенсивностей вибронных полос (I_1/I_3), являющееся количественной мерой полярности микроокружения молекул люминофора.

Экспериментально получено, что индекс полярности пирена на целлюлозной матрице при его сорбции из водно-мицеллярных растворов ниже, чем при сорбции из воды, и сравним с таковым в водно-мицеллярных растворах. Это свидетельствует о том, что значительная часть молекул пирена сорбируется на биоматрицу в сольбилизованном состоянии вместе с мицеллами ПАВ. Данное явление способствует повышению степени извлечения пирена из раствора и приводит к увеличению интенсивности его люминесценции.

Установлено, что максимальный сигнал люминесценции сорбированных целлюлозной биоматрицей ПАУ наблюдается при концентрациях ПАВ вблизи критических концентраций мицеллообразования.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ЛАЗЕРНОЙ ГИПЕРТЕРМИИ ОПУХОЛЕЙ

**Ирина Л. МАКСИМОВА¹, Никита М. РЫСКИН¹,
Георгий С. ТЕРЕНТЮК^{1,2}**

¹Саратовский государственный университет, Астраханская, 82, г. Саратов 410012, Россия

E-mail: irina_mksmv@yahoo.com; FAX: +7-8452-51-27-98

²Первая ветеринарная клиника, г. Саратов, Россия

Подход к лечению онкозаболеваний, основанный на сочетании лазерного фототермического воздействия и иммунотерапии, предполагает использование иммуностимулятора и фототермической реакции в качестве инициатора противоопухолевого иммунного ответа [1]. Фототерапия с активной иммуномодуляцией позволяет достичь двух целей. Первая – прямое разрушение клеток опухолей. Вторая – выработка длительных опухолеспецифических иммунных реакций, которые действуют в отношении гомологичных опухолевых антигенов. Биологическая модель для адаптивной иммунотерапии может быть в первом приближении разделена на три части: клетки-эффекторы, клетки опухоли и цитокины. В работе представлен анализ математической модели, описывающей нелинейную динамику системы антиген–антитело–интерлейкин, которую можно рассматривать как обобщение модели иммунной системы, предложенной ранее Ю.М. Романовским [2], а также моделей, учитывающих влияние интерлейкина на иммунную систему [3, 4]. Она представляет собой систему трех обыкновенных дифференциальных уравнений первого порядка. Предложенная модель в зависимости от управляющих параметров демонстрирует различные режимы динамики, которые качественно согласуются с представлениями о поведении иммунной системы. Исследована форма поверхности сепаратрисы для различных стационарных состояний. На животных со спонтанными опухолями исследовано влияние лазерной гипертермии в сочетании с иммуномодуляцией и без нее на динамику показателей иммунитета и степень развития опухолевого процесса.

1.Chen W.R., Zhu W.-G., Dynlacht J.R., Liu H. and Nordquist R.E. Long-term tumor resistance induced by laser photo-immunotherapy. *International Journal of Cancer*, 81: 808–812, 1999.

2. Романовский Ю.М., Степанова Н.В., Чернавский Д.С. Математическая биофизика. Москва «наука» 1984, 303 с.

3.Kirschner D., Panetta J.C., Modeling immunotherapy of the tumor immune interaction. *J. of Mathematical Biology*, 1998, v. 37, p. 235–252.

4.Isaeva O.G., Osipov V.A., Different strategies for cancer treatment: mathematical modeling. <http://arxiv.org/abs/q-bio.CV/0605046>

П6.3

ИЗУЧЕНИЕ ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ АЛЬБУМИНА МЕТОДОМ ТРИПЛЕТ-ТРИПЛЕТНОГО ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ МЕЖДУ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМИ ЗОНДАМИ

Андрей МЕЛЬНИКОВ

Саратовский государственный университет, физический факультет, Саратов, ул.
Астраханская, 83, 410026, Россия
E-mail: melnikov_gv@sstu.ru

Триплет-триплетный (Т-Т) перенос энергии электронного возбуждения, протекающий по обменно-резонансному механизму, осуществляется на расстоянии перекрывания электронных оболочек молекул донора и акцептора. Вероятность Т-Т переноса экспоненциально убывает с ростом расстояния между донором и акцептором, следовательно, заметная скорость переноса энергии наблюдается на небольших расстояниях. Это обстоятельство, а также значительное время жизни триплетных состояний люминесцентных зондов, связанных с белками, предполагает высокую чувствительность процесса Т-Т переноса к структурной перестройке в белках.

Нами наблюдался Т-Т перенос энергии электронного возбуждения между донором энергии – эозином и акцептором – антраценом, связанными с глобулой белка сывороточного альбумина человека (САЧ). Для проведения исследований нами был создан импульсный флуориметр с лазерным фотовозбуждением. Т-Т перенос энергии обнаружился по уменьшению интенсивности и времени жизни фосфоресценции эозина, при увеличении концентрации антрацена в фосфатном буфере рН 7,4 САЧ.

Изменение структуры белка осуществлялось добавлением поверхностно-активного вещества, в качестве которого был выбран додецилсульфат натрия (ДДС). Незначительные добавки ДДС, меньше критической концентрации мицеллообразования, приводят к уменьшению гидрофобных взаимодействий в белке и в результате осуществляется внутримолекулярная перестройка белка. Это регистрировалось нами по резкому уменьшению вероятности Т-Т переноса энергии. Следовательно, триплет-триплетный перенос энергии электронного возбуждения обладает высокой чувствительностью к внутримолекулярной структурной динамике в белках.

ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ КРАСНОГО СВЕТОДИОДНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ (625 НМ) НА МИКРООРГАНИЗМЫ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

Елена ТУЧИНА

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, 410012,
Саратов, Россия
E-mail: Firstflower@yandex.ru

В последние годы для лечения таких поражений кожи как псориаз, атопический дерматит, угревая сыпь, эффективно используются методы лазерной и фотодинамической терапии. Поскольку при фототерапии указанных заболеваний используется красное излучения, представляло интерес изучить влияние красного светодиодного излучения с длиной волны 625 нм на численность микроорганизмов *Propionibacterium acnes* и *Staphylococcus epidermidis*, одни из которых являются возбудителем кожного акне, а другие сопровождают ряд кожных заболеваний. В экспериментах использовали мощный светодиод с максимумом спектра испускания на длине волны 625 нм и плотностью мощности 31 мВт/см². Варьировали время облучения от 5 до 30 мин. Готовили взвеси микроорганизмов (1000 м.к./мл), затем подвергали действию излучения. После воздействия культуры переносили на чашки Петри с плотной питательной средой. Учет результатов проводили путем подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) через 24–72 часа после инкубации при 37°С. Контролем служили данные колониеобразующей способности бактерий не подвергнутых облучению. Каждая экспериментальная точка является усреднением 10 проведенных опытов. Значение контроля принимали за 100 %.

Использование красного излучения при фотовоздействии на *P. acnes*, основного возбудителя угревой сыпи, было достаточно эффективным. Снижение числа КОЕ на 30 % происходило после 5 мин облучения, на 70 % – после 30 мин. По всей видимости, терапевтический эффект фотовоздействия в частности связан с непосредственным уменьшением численности микроорганизмов *P. acnes*. Красное светодиодное излучение приводило к увеличению числа КОЕ бактерий вида *S. epidermidis* на 25 % по сравнению с контролем после 5 мин облучения и на 9 % после 30 мин. Известно, что данный вид способен оказывать антибиотическое действие на целый ряд других микроорганизмов. Таким образом, сокращение численности *P. acnes* и увеличение численности *S. epidermidis* после воздействия красным излучением (625 нм), вероятно, определяет улучшение клинической картины угревой сыпи. Фотодинамическая терапия с длинами волн 400–700 нм основывается на фотохимических особенностях молекул порфиринов – эндогенных красителей в клетках микроорганизмов. Воздействие света приводит к образованию порфиринами активных радикалов, которые незамедлительно вызывают разрушение бактериальной клетки. Бактерии *P. acnes* являются строгими анаэробами и чувствительны к действию активных форм кислорода, соответственно наблюдается выраженная гибель данных микроорганизмов под действием красного излучения. Бактерии *S. epidermidis* толерантны к действию кислорода, поскольку являются факультативными анаэробами, а так же имеют комплекс механизмов для нейтрализации активных радикалов.

Содержание

Обращение к участникам	3
Программа	6
Секция 1	35
Секция 2	71
Секция 3	117
Секция 4	135
Секция 5	179
Секция 6	207

**V Съезд
Российского фотобиологического общества**

Международная конференция
“Преобразование энергии света при фотосинтезе”
International Conference
“Light Energy Conversion in Photosynthesis”

Пушино, 8–13 июня 2008 г.

Тезисы докладов

Подписано в печать 27.05.08

Бумага офсетная № 1

Условных печ. л. – 14,9

Формат 60 x 90 1/16

Зак б/н

Усл. изд. л. – 11,0

Тираж 250 экз.

Издательско-полиграфический комплекс НИИ-Природа
119017, Москва, Старомонетный пер., 31.

Тел./факс: 951-28-12.