

УДК 577.32

## ФИТОФЛУИН – ЭФФЕКТИВНЫЙ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОР ОБРАЗОВАНИЯ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА ПОД ДЕЙСТВИЕМ УФ-А ИЗЛУЧЕНИЯ\*

© 2020 А.А. Ашихмин<sup>1</sup>, А.С. Бендикис<sup>2</sup>, А.А. Москаленко<sup>1</sup>, А.А. Красновский (мл.)<sup>2\*\*</sup>

<sup>1</sup> Институт фундаментальных проблем биологии РАН ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», 142290 Пушкино, Московская обл., Россия; электронная почта: AshikhminAA@gmail.com

<sup>2</sup> Институт биохимии имени А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071 Москва, Россия; электронная почта: phoal@mail.ru

Поступила в редакцию 29.04.2020

После доработки 26.05.2020

Принята к публикации 04.06.2020

Известно, что фитонин и фитофлуин, бесцветные  $C_{40}$  каротиноиды с короткой цепью сопряженных двойных связей (3 и 5 соответственно), являются универсальными предшественниками в биосинтезе окрашенных каротиноидов в фотосинтезирующих организмах. Общепринято представление о том, что  $C_{40}$  каротиноиды играют роль фотопротекторов клеток и тканей. Используя измерение фотосенсибилизированной фосфоресценции синглетного кислорода ( $^1O_2$ ), мы обнаружили, что фитофлуин является исключением из этого правила, так как эффективно (с квантовым выходом  $85 \pm 5\%$ ) фотосенсибилизирует образование  $^1O_2$  в азрированных растворах под действием УФ-А излучения. При этом фитонин почти неактивен в качестве фотосенсибилизатора. Показано, что оба каротиноида тушат  $^1O_2$  в темноте. Полученные константы скорости тушения ( $(4 \pm 1) \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$  для фитонина и  $(2 \pm 0,5) \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$  для фитофлуина) на 2–3 порядка меньше, чем константы скорости контролируемых диффузией реакций. Таким образом, протекторные свойства обоих каротиноидов относительно слабо выражены. Более того, фитофлуин, благодаря его высокой фотосенсибилизирующей активности, можно рассматривать как потенциальный фотостимулятор повреждения клеток и перспективный УФ-А фотосенсибилизатор для медицинских целей.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** фитофлуин, фитонин, синглетный кислород, фотосенсибилизация, УФ-А.

DOI: 10.31857/S0320972520070052

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что фотосинтезирующие организмы синтезируют окрашенные каротиноиды, содержащие 9 и более сопряженных двойных связей (СДС), которые служат эффективными протекторами живых тканей, защищая их от фотоокислительного стресса. Показано, что протекторные свойства основаны на способности каротиноидов эффективно дезактивировать триплетные состояния хлорофиллов и бактериохлорофиллов, тушить синглетный кислород ( $^1O_2$ ) и нейтрализовать свободные радикалы [1, 2]. Напротив, зрительный пигмент ретиналь, представ-

ляющий собой полиен с короткой цепью СДС (6 СДС), является эффективным фотосенсибилизатором образования  $^1O_2$  в неполярной среде [2, 3]. Этот процесс, вероятно, вызывает фотодинамическое повреждение сетчатки и различные заболевания глаз [4].

Известно, что  $C_{40}$  каротиноиды с короткими цепями СДС (3–7 СДС) (фитонин, фитофлуин,  $\zeta$ -каротин) образуются в фотосинтезирующих бактериях, зеленых растениях и водорослях, поскольку являются универсальными предшественниками в биосинтезе окрашенных каротинов и ксантофиллов, имеющих длинную цепь СДС [1]. Исходя из этих представлений, было высказано предположение, что полиены с короткими цепями СДС могут вызывать фотодинамическое повреждение фотосинтетических тканей [5]. Кроме того, недавно было обнаружено, что под действием сине-зеленого света, который преимущественно поглощается каротиноидами, в мембранах пурпурных бактерий наблюдается фотоокисление бактериохлорофилла В-850 кислородом и образование  $^1O_2$  [6–10]. С

Принятые сокращения:  $^1O_2$  – синглетный кислород, УФ – ультрафиолет, СДС – сопряженная двойная связь,  $\Phi_{\Delta}$  – квантовый выход генерации  $^1O_2$ .

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemistry>, в рубрике «Papers in Press», ВМ20-107, 19.06.2020.

\*\* Адресат для корреспонденции.

другой стороны, фитоин и фитофлуин обнаруживаются в широко употребляемых продуктах питания и являются преобладающими каротиноидами в плазме крови и тканях человека. Было показано, что они реагируют со свободными радикалами, и поэтому применяются в качестве протекторов кожи и продуктов питания от окислительного стресса и ультрафиолетового (УФ) излучения [11, 12]. Тем не менее, насколько нам известно, систематический анализ генерации  $^1\text{O}_2$   $\text{C}_{40}$  каротиноидами – предшественниками в биосинтезе  $\beta$ -каротина – никогда не проводился, хотя триплетные состояния некоторых соединений этой группы были исследованы методом импульсного фотолиза [13, 14]. Недавно в предварительных тестовых измерениях, проведенных нашей группой, обнаружилось, что фитофлуин является исключительно эффективным фотосенсибилизатором образования  $^1\text{O}_2$ , который превосходит по этой способности транс-ретинол. Это наблюдение стимулировало нас к детальному исследованию генерации  $^1\text{O}_2$  этим каротиноидом и его биосинтетическим предшественником – фитоином. Для анализа применяли измерение фотосенсибилизированной фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  [15]. Полученные результаты представлены в настоящей работе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Транс формы фитоина и фитофлуина были выделены из клеток двух серных фотосинтезирующих бактерий *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* (штамм ATCC 51935<sup>T</sup>) и *Allochrochromatium vinosum* (штамм МГУ<sup>T</sup>, старое название *Allochrochromatium minutissimum*). Культура клеток *E. haloalkaliphila* получена от профессора J. F. Imhoff («Helmholtz Centre for Ocean Research», Германия), культура *A. vinosum* была предоставлена кафедрой микробиологии МГУ имени М. В. Ломоносова. Бактериальные клетки были выращены в анаэробных условиях в присутствии 53 и 71 мкМ дифениламина (ДФА) («Реахим», Россия) на белом свете интенсивностью 90 Вт/м<sup>2</sup> на средах Пфеннига и Ларсена [16, 17]. Собранные клетки были разрушены с помощью ультразвука с использованием генератора УЗГ13-0.1-22 («Ультразвуковая техника», Россия). Неповрежденные клетки и фрагменты клеточных стенок удаляли центрифугированием в центрифуге K24 («Janetzki», Германия) в течение 10 мин при 4500 об./мин и 10 000 об./мин для *E. haloalkaliphila* и *A. vinosum* соответственно [16–18].

Каротиноиды экстрагировали из бактериальных мембран, используя смесь ацетона, ме-

танола и петролейного эфира, и затем очищали, используя методы хроматографии. Более подробная информация о процедуре выделения каротиноидов была описана ранее [18].

Синглетный кислород исследовали путем измерения его собственной инфракрасной фосфоресценции при 1270 нм, которая возникает в результате переноса энергии от триплетного состояния молекул фотосенсибилизатора на кислород с последующим заселением возбужденного синглетного ( $^1\Delta_g$ ) состояния молекул кислорода. Измерения проводили с использованием нового лазерного/светодиодного спектрометра, недавно сконструированного в институте биохимии им. А.Н. Баха РАН [19]. Спектрометр позволял регистрировать фосфоресценцию при стационарном возбуждении светодиодами с максимумами излучения при 281, 350 и 371,5 нм («AQMEPAN», Китай) и 399,5 нм («Полироник», Москва, Россия) и при импульсном возбуждении светодиодом с максимумом излучения при 405 нм («Альком Медика», Санкт-Петербург, Россия). Излучение светодиодов фокусировали в пятно диаметром 5 мм на поверхности кварцевой кюветы (1 см) с исследуемым раствором. Интенсивность возбуждающего света контролировали измерителем мощности ThorLabs PM-100D с сенсорной головкой S120VC («ThorLabs», США). Фосфоресценцию  $^1\text{O}_2$  измеряли под углом 90° с помощью охлаждаемого фотоумножителя ФЭУ-112 («Экран оптические системы», Новосибирск, Россия) со спектральной характеристикой С-1 через отсекающие фильтры, которые пропускают ИК-свет на  $\lambda \geq 1000$  нм, и один из трех сменных интерференционных фильтров с максимумами пропускания при 1230, 1270 и 1310 нм и полушириной 10 нм. Стационарную интенсивность фосфоресценции измеряли цифровым милливольтметром («Эконикс-Эксперт», Россия).

Для кинетических измерений образцы облучали импульсами синего света при 405 нм. Длительность импульса изменяли от 1 до 10 мкс, частота повторения импульсов 5–100 Гц [19]. Сигнал фотоумножителя через предварительный усилитель поступал на USB-плату, работающую в режиме разрешенного во времени счета фотонов («Парсек», Россия). Постоянная времени записи системы составляла ~10 нс. Счетная плата, которая запускалась от дополнительного импульса блока управления, синхронизированного с импульсом светодиода, делила временной интервал между вспышками на 512 или 1024 канала. Кинетические кривые были получены путем накопления импульсов фотоумножителя в каждом канале. Квантовый выход генерации  $^1\text{O}_2$  ( $\Phi_\Delta$ ) измеряли, используя в качестве

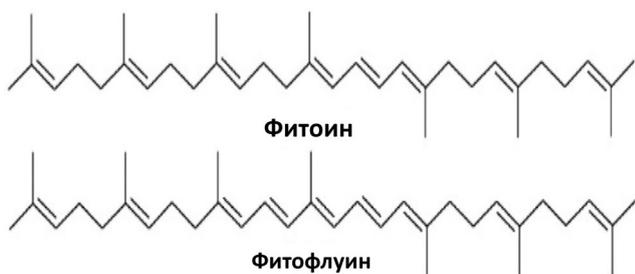


Рис. 1. Структурные формулы изучаемых каротиноидов.

ве эталона органический фотосенсибилизатор феноленон (perinaphthenone, 1H-phenalen-1-one) («Merk», Германия), который имеет широкую полосу поглощения с максимумом при 350 нм и заметное поглощение при 405 нм. Известно, что квантовый выход фотогенерации  $^1\text{O}_2$  феноленоном близок к 1 ( $0,95 \pm 0,05$ ) [20, 21]. Эксперименты проводили, используя в качестве растворителей гексафторбензол ( $\text{C}_6\text{F}_6$ ) и перфторгексан, специально очищенные для наших экспериментов («Пиминвест», Россия).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 показана химическая структура исследуемых каротиноидов. Видно, что фитоин имеет 3 СДС, а фитофлуин – 5 СДС.

Спектры поглощения каротиноидов приведены на рис. 2. Видно, что максимумы поглощения фитоина находятся в УФ-В области

250–310 нм, поэтому фитоин растворяли в перфторгексане, который достаточно прозрачен в этой области спектра. Максимумы поглощения фитофлуина лежат в УФ-А области 320–400 нм. Кроме того, фитофлуин плохо растворяется в перфторгексане, поэтому его растворяли в гексафторбензоле, который достаточно прозрачен в УФ-А области, но не прозрачен в области УФ-В. Именно поэтому спектры поглощения каротиноидов измеряли в разных растворителях. Были и другие причины использования гексафторбензола и перфторгексана в качестве растворителей. Молекулы этих соединений не имеют атомов водорода и поэтому слабо тушат  $^1\text{O}_2$ . По этой причине время жизни  $^1\text{O}_2$  ( $\tau_\Delta$ ) и интенсивности фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  в несколько сотен раз больше, чем в органических растворителях, содержащих атомы водорода, в которых времена жизни  $^1\text{O}_2$  обычно составляют 10–300 мкс [19]. Использование менее дорогих растворителей, содержащих вместо водорода атомы хлора, ( $\text{CCl}_4$  и фреоны), оказалось невозможным для наших исследований, поскольку при облучении в хлорсодержащих растворителях происходило быстрое фоторазрушение каротиноидов вследствие эффективной фотохимической реакции. Фторсодержащие растворители не реагировали с возбужденными молекулами каротиноидов. Для расчета концентраций пигментов были использованы следующие молярные коэффициенты поглощения (в  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): фитоин, 50 000 (при 282 нм); фитофлуин, 73 000 (при 350 нм) [22] и феноленон, 97 000 (при 351 нм) [20, 21].

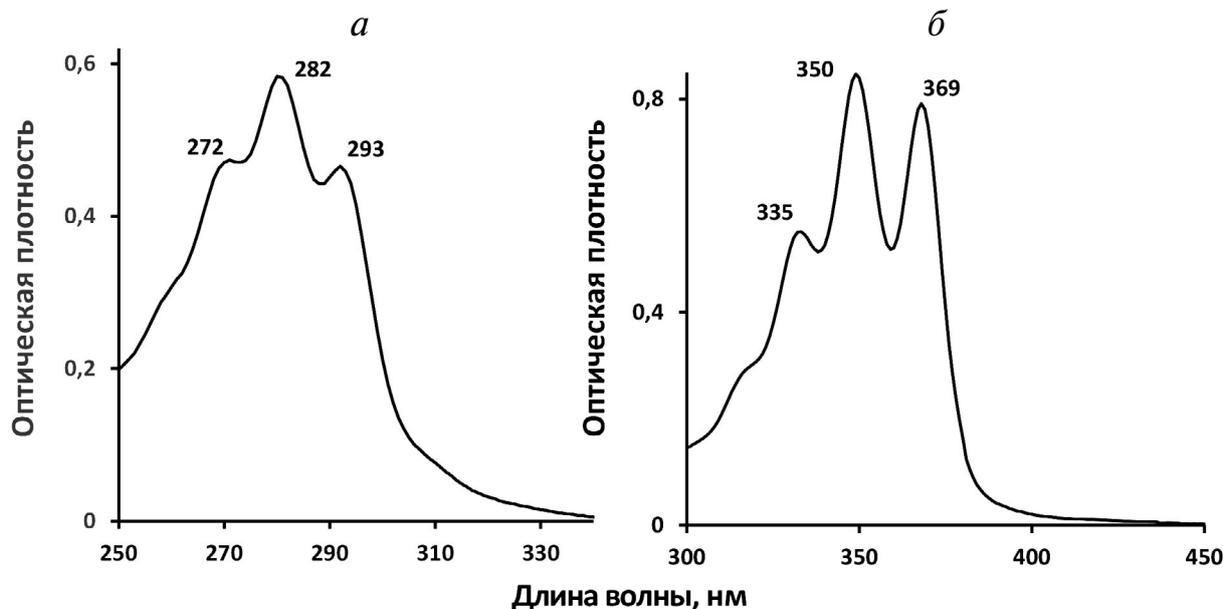


Рис. 2. Спектры поглощения фитоина в перфторгексане (а) и фитофлуина в гексафторбензоле (б) в кварцевой кювете (1 см) после вычитания фонового поглощения растворителей

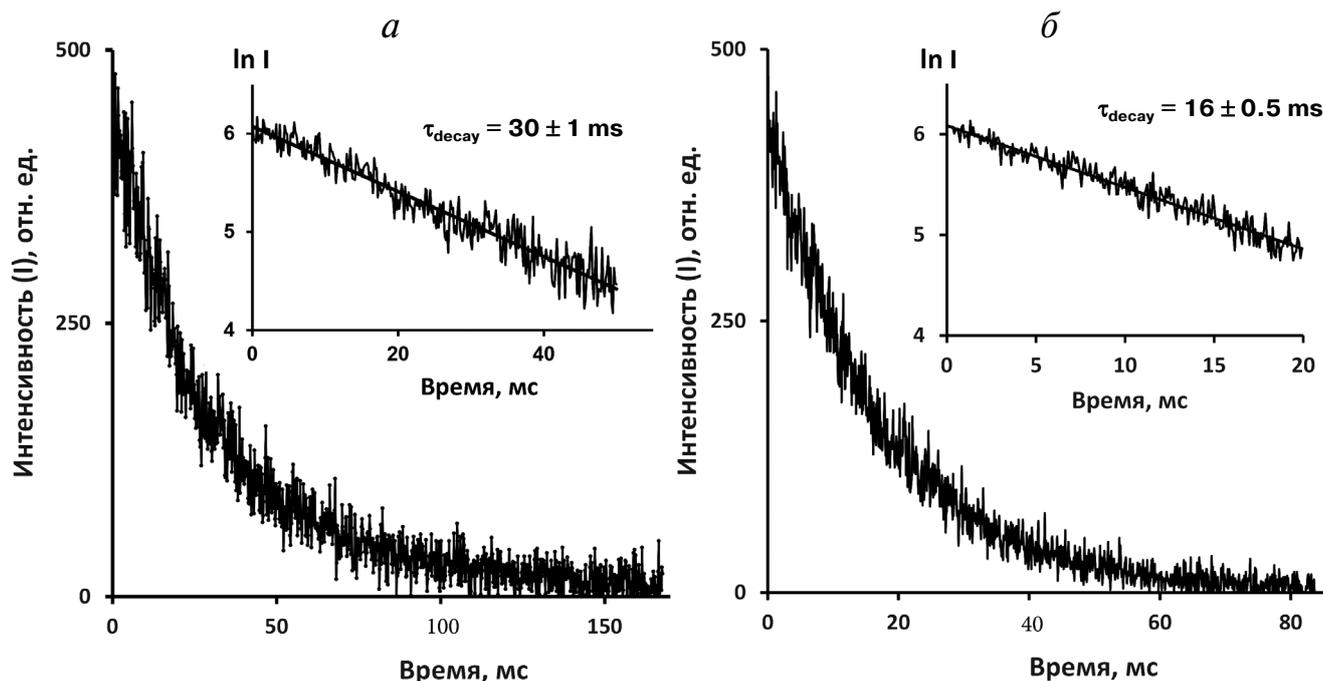


Рис. 3. Кривые затухания фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  в растворах феноаленона ( $\sim 3$  мкМ) в перфторгексане (а) и гексафторбензоле (б) после облучения 10 мкс светодиодными импульсами (405 нм) в присутствии воздуха. Кривые получены при частоте повторения импульсов 5 и 10 Гц путем 30 и 15-минутного накопления сигнала. Средняя мощность возбуждающего света составляла 20 и 40 мкВт соответственно. На врезках показаны кривые затухания в полулогарифмическом масштабе

Кинетические кривые фотосенсибилизированной фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  в перфторгексане и гексафторбензоле после возбуждения короткими импульсами фиолетового светодиода (405 нм) показаны на рис. 3. В качестве фотосенсибилизатора использовали феноаленон. Видно, что кривые затухания хорошо описываются экспонентами с временем жизни 16 мс в гексафторбензоле и 30 мс в перфторгексане.

Как фитоин, так и фитофлуин практически не поглощают свет на длине волны использованного нами импульсного светодиода (405 нм), поэтому для возбуждения этих каротиноидов применяли стационарное излучение светодиодов при 281 и 371 нм. При облучении этими светодиодами растворы феноаленона в обоих растворителях излучали достаточно сильную фосфоресценцию  $^1\text{O}_2$  с максимумом при 1270 нм.

Рис. 4 иллюстрирует относительные квантовые выходы фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  в растворах фитоина и феноаленона. Фитоин изучали в перфторгексане при возбуждении при 281 нм (3,5 мВт). В этих условиях растворы фитоина излучали очень слабую люминесценцию при 1270 нм. Феноаленон почти не поглощал свет в области 281 нм, поэтому для получения надежных результатов феноаленон облучали светодиодом при 371 нм. Поглощение обоих соединений

равно 0,13 на длинах волн возбуждения. Это соответствовало концентрациям 2,6 мкМ фитоина и 1,7 мкМ феноаленона. После нормирования на число падающих фотонов и вычитания фонового сигнала люминесценции, испускаемой растворителем без фотосенсибилизатора, мы получили, что интенсивность фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  в растворе фитоина примерно в 100 раз меньше, чем в растворе феноаленона. Известно, что фитоин и фитофлуин способны тушить  $^1\text{O}_2$ , хотя константы скорости этого процесса невелики, причем их точные значения ранее измерить не удалось [23]. Тушение  $^1\text{O}_2$  феноаленоном очень слабо выражено [19]. Чтобы выяснить, как тушение  $^1\text{O}_2$  фитоином влияет на общий выход фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  в растворах фитоина, мы провели измерение константы скорости тушения  $^1\text{O}_2$  фитоином. Это было сделано путем измерения скорости затухания фотосенсибилизированной феноаленоном фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  при добавлении разных концентраций фитоина. В качестве растворителя был использован гексафторбензол, так как оба соединения – фитоин и феноаленон – растворимы в этом растворителе и недостаточно хорошо растворимы в перфторгексане. Из рис. 4, б видно, что тушение  $^1\text{O}_2$  фитоином подчиняется уравнению Штерна–Фольмера:

$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_q[\text{Car}], \quad (1)$$

где  $k_{\text{obs}}$  – наблюдаемая константа скорости затухания фосфоресценции (в  $\text{с}^{-1}$ ) ( $k_{\text{obs}} = 1/\tau_{\Delta}$ , где  $\tau_{\Delta}$  – время жизни  $^1\text{O}_2$ ) после импульсов светодиода в растворах, содержащих как фотосенсибилизатор, так и каротиноиды;  $k_0$  – константа скорости затухания фосфоресценции в растворах феналенона без каротиноида;  $k_q$  – бимолекулярная константа скорости тушения  $^1\text{O}_2$  каротиноидом;  $[\text{Car}]$  – молярная концентрация каротиноида.

Из рис. 4, б следует, что для фитоина  $k_q = (4 \pm 1) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$ . Это значение согласуется с данными работы Mathews-Roth et al., которые получили, что  $k_q < 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$  [23]. Следовательно, фитоин является относительно слабым тушителем  $^1\text{O}_2$ . При концентрации 2,6 мкМ фитоин увеличивает скорость затухания фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  в гексафторбензоле в 1,16 раза ( $k_q[\text{Car}]/k_0 = 0,16$ ). Для стационарной интенсивности фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  уравнение (1) может быть представлено в виде:

$$I_0/I_q = 1 + k_q/k_0 [\text{Car}], \quad (2)$$

где  $I_0$  и  $I_q$  – стационарная интенсивность фотосенсибилизированной феналеноном фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  в отсутствие и в присутствии фитоина. Из этого уравнения следует, что в присут-

ствии 2,6 мкМ фитоина стационарная интенсивность фосфоресценции уменьшается на 16% по сравнению с раствором феналенона без каротиноида.

Поскольку время жизни  $^1\text{O}_2$  в перфторгексане в два раза больше, т.е.  $k_0$  соответственно в два раза меньше, чем в гексафторбензоле (рис. 4), а константа  $k_q$  одинакова в обоих растворителях, используя уравнение (2) можно рассчитать, что при тушении фитоином в перфторгексане интенсивность фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  должна уменьшиться в 1,3 раза ( $(k_q[\text{Car}]/k_0) \approx 0,3$ ). Следовательно, тушение  $^1\text{O}_2$  фитоином не может объяснить низкую интенсивность фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  в растворе фитоина (рис. 4). Отсюда следует, что этот эффект – результат низкой величины квантового выхода генерации  $^1\text{O}_2$  фитоином ( $\Phi_{\Delta}$ ). Исходя из этого, можно утверждать, что для фитоина  $\Phi_{\Delta} < 2\%$ . Эта величина коррелирует с данными импульсного фотолиза, полученными Bensansson et al. [14], согласно которым выход триплетного состояния фитоина очень низок и составляет  $\leq 0,002$ . Для подробного изучения фитоина необходимы дальнейшие измерения.

Фитофлуин исследовали в гексафторбензоле при возбуждении непрерывным светом светодиодов при 371 нм (2–3 мВт). После облучения раствора фитофлуина наблюдали достаточно сильную инфракрасную фосфоресценцию со

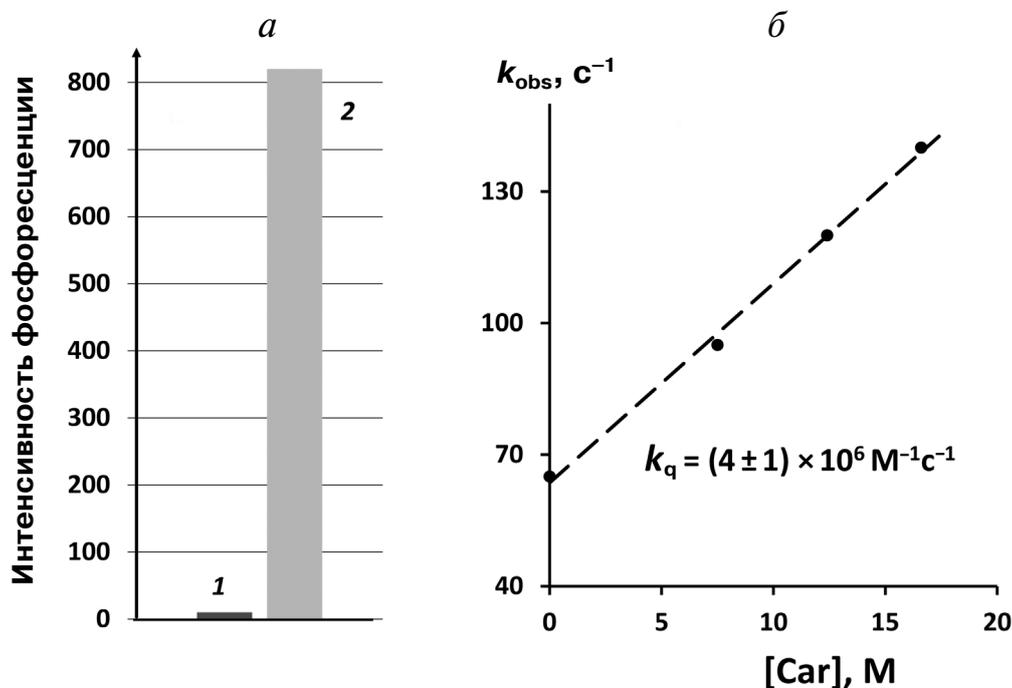


Рис. 4. Генерация и тушение  $^1\text{O}_2$  фитоином: а – относительная интенсивность фотосенсибилизированной фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  в растворах фитоина (1) и феналенона (2) в перфторгексане при фотовозбуждении соответственно при 281 нм и 371 нм. Оптическая плотность одинакова (0,13) в области возбуждения; б – тушение фотосенсибилизированной феналеноном фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  в гексафторбензоле при добавлении фитоина, длина волны возбуждения 405 нм

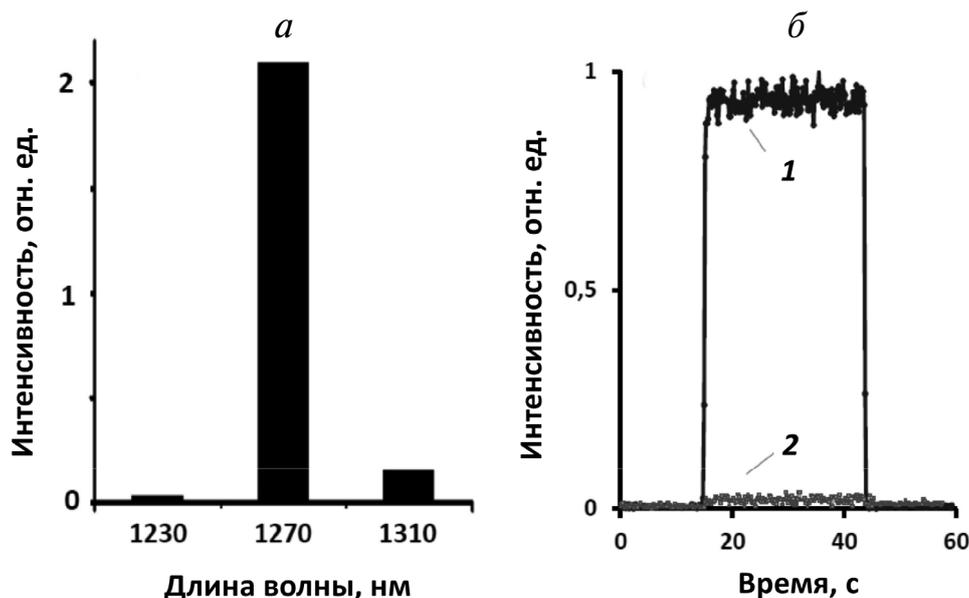


Рис. 5. Параметры фосфоресценции  $^1\text{O}_2$ , фотосенсибилизированной фитофлуином в гексафторбензоле. *a* – Спектр фосфоресценции; *б* – интенсивность фосфоресценции до (1) и после (2) добавления 50% ацетона. Фосфоресценцию возбуждали непрерывным светом светодиода при 371 нм ( $\approx 3,5$  мВт)

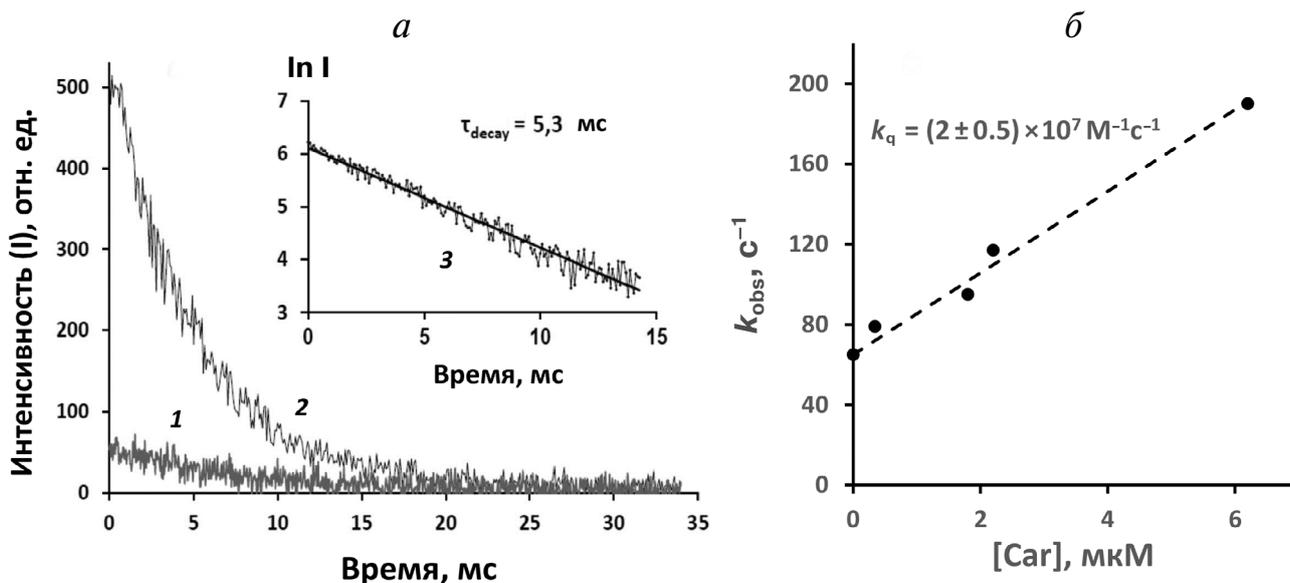


Рис. 6. Генерация и тушение фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  фитофлуином в гексафторбензоле. *a* – Кривые затухания фосфоресценции после возбуждения светодиодными импульсами (10 мкс, 405 нм) в растворе фитофлуина (6,2 мкМ) (1) и в растворе феналенона с добавлением 6,2 мкМ фитофлуина (2) (частота повторения импульсов 30 Гц; время усреднения 15 мин); на врезке показана кривая 2 в полулогарифмических координатах (3). *б* – Тушение фотосенсибилизированной феналеноном (2 мкМ) фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  при добавлении фитофлуина

спектральным максимумом при 1270 нм (рис. 5). После добавления 50% ацетона, что приводило к резкому уменьшению времени жизни  $^1\text{O}_2$ , фотосенсибилизированная фосфоресценция ослаблялась примерно в 500 раз (рис. 5). Аналогичный эффект наблюдался в растворах фенале-

нона в гексафторбензоле [18]. Спектр действия этой фосфоресценции, оцененный с использованием трех светодиодов с фиксированными длинами волн 350, 371 и 399 нм (данные не показаны), соответствовал спектру поглощения фитофлуина.

Из-за малой оптической плотности фитофлуина на длине волны нашего импульсного светодиода (405 нм) точное измерение временных параметров фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  представляло большие трудности. Тем не менее из рис. 6 видно, что нам удалось зарегистрировать слабый кинетический сигнал фосфоресценции  $^1\text{O}_2$ , возникающий при импульсном облучении достаточно концентрированного (6,2 мкМ) раствора фитофлуина с поглощением  $\sim 0,01$  при 405 нм. Время затухания составило  $\sim 5$  мс, что примерно в 3 раза меньше, чем в разбавленном растворе феналенона в отсутствие каротиноида (рис. 3). Это показывает, что при использованной концентрации фитофлуина происходит тушение  $^1\text{O}_2$ . Чтобы проверить это предположение, был приготовлен раствор, который содержал фитофлуин той же концентрации, что и в предыдущем эксперименте и феналенон с поглощением 0,1 при 405 нм. В этом растворе наблюдалась сильная фосфоресценция  $^1\text{O}_2$  при 1270 нм. Установлено, что ее время жизни совпадает с временем жизни фосфоресценции в растворе чистого фитофлуина (рис. 6). Более того, начальная интенсивность фосфоресценции в растворе феналенона увеличена примерно в 10 раз по сравнению с раствором фитофлуина, т.е. относительная интенсивность фосфоресценции примерно пропорциональна значениям оптической плотности пигментов в области возбуждения. Этот факт говорит о том, что квантовые выходы генерации  $^1\text{O}_2$  фитофлуином и феналеноном примерно одинаковы.

Дальнейшие эксперименты были направлены на более детальное исследование способности фитофлуина генерировать и тушить  $^1\text{O}_2$ . Рисунок 6, б показывает, что тушение фотосенсибилизированной феналеноном (2 мкМ) фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  при добавлении фитофлуина хорошо описывается уравнением Штерна–Фольмера (1). Из рис. 6 следует, что константа скорости тушения  $^1\text{O}_2$  фитофлуином составляет  $(2,0 \pm 0,5) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$ . Это значение согласуется с оценкой, приведенной в работе Mathews-Roth et al. [23], согласно которой  $k_q < 10^8 \text{ M}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$ .

Для определения квантового выхода генерации синглетного кислорода фитофлуином сравнивали интенсивности фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  в растворах фитофлуина и феналенона в гексафторбензоле, имеющих равное поглощение (0,15) при 371 нм, что соответствует концентрациям фитофлуина и феналенона, равным примерно 2 и 1,4 мкМ. В этих условиях интенсивность фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  в растворе фитофлуина составляла  $\sim 60\%$  от интенсивности фосфоресценции в растворе феналенона. Уменьшение интенсивности фосфоресценции в растворе фи-

Квантовые выходы генерации  $^1\text{O}_2$  и константы скорости тушения  $^1\text{O}_2$  каротиноидами, полученные в настоящей работе

Каротиноид	СДС	$\Phi_\Delta$	$k_q, \text{M}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$
Фитоин*	3	$< 0,02$	$(4 \pm 1) \pm 10^6$
Фитофлуин	5	$0,85 \pm 0,05$	$(2 \pm 0,5) \pm 10^7$

\*  $\Phi_\Delta$  для фитоина получена в перфторгексане, другие данные – в гексафторбензоле.

тофлуина частично связано с тушением  $^1\text{O}_2$  этим каротиноидом (рис. 6, б). Используя уравнение (2) и полученное для фитофлуина значение  $k_q$ , можно рассчитать, что при концентрации фитофлуина 2 мкМ интенсивность фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  уменьшается в 1,5 раза по сравнению с раствором феналенона в отсутствие каротиноида. Учитывая это тушение и значение  $\Phi_\Delta$  для феналенона, равное 0,95 [20, 21], мы получаем для фитофлуина величину  $\Phi_\Delta = 0,95 \times 0,6 \times 1,5 = 0,85$ . По нашей оценке, статистическая погрешность составляет  $\pm 5\%$ . Полученные данные обобщены в таблице.

Таким образом, наши данные показывают, что фитоин и фитофлуин, которые являются универсальными предшественниками в биосинтезе окрашенных каротиноидов у растений и бактерий, сильно различаются по своей способности фотосенсибилизировать и тушить  $^1\text{O}_2$ . Фитоин менее эффективен в обоих этих процессах. При этом способность обоих каротиноидов тушить  $^1\text{O}_2$  выражена на 2–3 порядка слабее, чем у ликопина или  $\beta$ -каротина [2, 5, 15]. В то же время фитофлуин проявляет очень высокую фотосенсибилизирующую активность. Насколько нам известно, в настоящей работе это свойство фитофлуина было обнаружено впервые. Полученные данные свидетельствуют о том, что при фотовозбуждении фитофлуин эффективно заселяет достаточно долгоживущее триплетное состояние, способное передавать энергию кислороду. В настоящее время информация о квантовом выходе и времени жизни триплетов фитофлуина отсутствует. По крайней мере, нам эту информацию в литературе найти не удалось. Тем не менее энергия триплетного состояния ( $E_T$ ) может быть оценена, исходя из линейной зависимости между  $E_T^{-1}$  и числом СДС, приведенной в работе Bensasson et al. [14]. С помощью этой зависимости мы получили, что для фитофлуина энергия  $E_T = 1,45$  эв, т.е. выше, чем энергия  $^1\Delta_g$  состояния кислорода (1 эв). Таким образом, образование  $^1\text{O}_2$  триплетным фитофлуином энергетически разрешено.

Кроме того, известно, что фитофлуин испускает довольно сильную флуоресценцию при 500 нм с квантовым выходом  $0,05 \pm 0,01$  при комнатной температуре [24, 25]. Это необычно для  $C_{40}$  каротиноидов, выход флуоресценции которых обычно составляет менее  $10^{-3}$  [24, 25]. Следовательно, по фотофизическим свойствам фитофлуин напоминает больше хлорофилл *a* и порфирины, чем  $C_{40}$  полиены. Исходя из этого можно предположить, что фитофлуин, как и порфириновые макроциклы, может быть эффективным фотосенсибилизатором фотохимических процессов. По нашему мнению, это наблюдение сильно изменяет представление о биологической роли этого соединения. В частности, не исключено участие фитофлуина в биологических эффектах УФ-А света [26] и в фотостимуляции повреждения фотосинтетического аппарата растений и тканей кожи человека и животных. Кроме того, фитофлуин потенциально пригоден в качестве фотосенсибилизатора УФ-А излучения в косметологии и медицине. Однако, учитывая высокую фотосенсибили-

зирующую активность фитофлуина, вызывает сомнение целесообразность его применения для защиты кожи от ультрафиолетового излучения.

**Финансирование.** Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 18-04-00684-а и 19-04-00331-а) и государственных заданий ФИЦ Биотехнологии РАН и ФИЦ ПНЦБИ РАН.

**Благодарности.** Авторы благодарят ООО «Полироник» (Москва), ООО «Алком Медика» (Санкт-Петербург) за техническую помощь и ООО «Пиминвест» (Москва) за предоставление и очистку растворителей.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Britton, G. (2008) Functions of Intact Carotenoids., in *Carotenoids. Natural Functions* (Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfanger, H. eds.) Birkhauser Verlag, Switzerland, pp. 265-308.
2. Edge, R., and Truscott, T. G. (2018) Singlet oxygen and free radical reactions of retinoids and carotenoids – a review, *Antioxidants*, **7**, 5-16.
3. Krasnovsky, A. A., Jr., and Kagan, V. E. (1979) Photosensitization and quenching of singlet oxygen by pigments and lipids of photoreceptor cells of the retina, *FEBS Lett.*, **108**, 152-154.
4. Ostrovskii, M. A., and Fedorovich, I. B. (1994) Retinal as sensitizer of photodamage of retinal-containing proteins in the retina of the eye, *Biophysica*, **39**, 13-25.
5. Krasnovskii, A. A., Jr. (1986) Singlet oxygen in photosynthesizing organisms, *Zhurn. Vsesoyuz. Khim. Obsch. im. D. I. Mendeleeva*, (*Mendeleev Chemical Journal*), **31**, 562-567.
6. Makhneva, Z. K., Erokhin, Yu. E., and Moskalenko, A. A. (2007) Carotenoid-photosensitized oxidation of bacteriochlorophyll dimers in light-harvesting complexes B800-850 in *Allochrochromatium minutissimum* cells, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **416**, 256-259.
7. Makhneva, Z. K., Bolshakov, M. A., Ashikhmin, A. A., Erokhin, Y. E., and Moskalenko, A. A. (2009) Influence of blue light on the structure stability of antenna complexes from *Allochrochromatium minutissimum* with different content of carotenoids, *Biochemistry Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.*, **3**, 123-127.
8. Makhneva, Z. K., Ashikhmin, A. A., Bolshakov, M. A., and Moskalenko, A. A. (2020) Carotenoids are probably involved in singlet oxygen generation in the membranes of purple photosynthetic bacteria under light irradiation, *Microbiology*, **89**, 164-173.
9. Makhneva, Z. K., Ashikhmin, A. A., Bolshakov, M. A., and Moskalenko, A. A. (2019) Bacteriochlorophyll interaction with singlet oxygen in membranes of purple photosynthetic bacteria: does the protective function of carotenoids exist? *Dokl. Biochem. Biophys.*, **486**, 216-219.
10. Makhneva, Z. K., Ashikhmin, A. A., Bolshakov, M. A., and Moskalenko, A. A. (2019) Quenchers protect BChl850 from action of singlet oxygen in the membranes of a sulfur photosynthetic bacterium *Allochrochromatium vinosum* Strain MSU, *Microbiology*, **88**, 79-86.
11. Meléndez-Martínez, A. J., Stinco, C. M., and Mapelli-Brahm, P. (2019) Skin carotenoids in public health and nutraceuticals: the emerging roles and applications of the UV radiation-absorbing colourless carotenoids phytoene and phytofluene, *Nutrients*, **11**, 1093.
12. Meléndez-Martínez, A. J., Mapelli-Brahm, P., and Stinco, C. M. (2018) The colourless carotenoids phytoene and phytofluene: From dietary sources to their usefulness for the functional foods and nutraceuticals industries, *J. Food Compos. Anal.*, **67**, 91-103.
13. Mathis, P., and Kleo, J. (1973) The triplet state of  $\beta$ -carotene and of analog polyenes of different length, *Photochem. Photobiol.*, **18**, 343-346.
14. Bensasson, R., Land, E. J., and Maudinas, B. (1976) Triplet states of carotenoids from photosynthetic bacteria studied by nanosecond ultraviolet pulse irradiation, *Photochem. Photobiol.*, **23**, 189-193.
15. Krasnovsky, A. A., Jr. (1979) Photoluminescence of singlet oxygen in pigment solutions, *Photochem. Photobiol.*, **29**, 29-36.
16. Moskalenko, A. A., and Makhneva, Z. K. (2012) Light-harvesting complexes from purple sulfur bacteria *Allochrochromatium minutissimum* assembled without carotenoids, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **108**, 1-7.
17. Ashikhmin, A., Makhneva, Z., Bolshakov, M., and Moskalenko, A. (2014) Distribution of colored carotenoids between light-harvesting complexes in the process of recovering carotenoid biosynthesis in *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* cells, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **141**, 59-66.

18. Ashikhmin, A., Makhneva, Z., Bolshakov, M., and Moskalenko, A. (2017) Incorporation of spheroidene and spheroidenone into light-harvesting complexes from purple sulfur bacteria, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **170**, 99-107.
19. Krasnovsky, A. A., Jr., Benditkis, A. S., and Kozlov, A. S. (2019) Kinetic measurements of singlet oxygen phosphorescence in the solvents lacking hydrogen atoms using the method of time resolved photon counting, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 153-163.
20. Oliveros, E., Suardi-Murasecco, P., Aminian-Saghafi, T., and Braun, A. M. (1991) 1H-Phenalen-1-one: photophysical properties and singlet oxygen production, *Helv. Chim. Acta*, **74**, 79-90.
21. Schmidt, R., Tanelian, C., Dunsbach, R., and Wolf, C. (1994) Phenalenone, a universal compound for the determination of quantum yields of singlet oxygen O<sub>2</sub> (<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) sensitization, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, **79**, 11-17.
22. Britton, G. (1995) UV/visible spectroscopy, in *Carotenoids* (Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfander, H., eds.) vol. 1B, Birkhäuser Verlag, Basel.
23. Mathews-Roth, M. M., Wilson, T., Fujimori, E., and Krinsky, N. I. (1974) Carotenoid chromophore length and protection against photosensitisation, *Photochem. Photobiol.*, **19**, 217-222.
24. Cogdell, R. J., Gillbro, T., Andersson, P. O., Liu, R. S. H., and Asato, A. E. (1994) Carotenoids as accessory light-harvesting pigments, *Pure Appl. Chem.*, **66**, 1041-1046.
25. Andersson, P. O., Takaichi, S., Cogdell, R. J., and Gillbro, T. (2001) Photophysical characterization of natural cis-carotenoids, *Photochem. Photobiol.*, **74**, 549-557.
26. Fraikin, G. Y., and Rubin, L. B. (1979) Some physiological effects of near-ultraviolet light on microorganisms, *Photochem. Photobiol.*, **29**, 185-187.

## PHYTOFLUENE AS A HIGHLY EFFICIENT UVA PHOTOSENSITIZER OF SINGLET OXYGEN GENERATION\*

A. A. Ashikhmin<sup>1</sup>, A. S. Benditkis<sup>2</sup>, A. A. Moskalenko<sup>1</sup>, and A. A. Krasnovsky, Jr.<sup>2\*\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Basic Biological Problems, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; E-mail: AshikhminAA@gmail.com

<sup>2</sup> Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia; E-mail: phoal@mail.ru

Received April 29, 2020

Revised May 26, 2020

Accepted June 4, 2020

Phytoene and phytofluene – uncolored C<sub>40</sub> carotenoids with short chain of conjugated double bonds (3 and 5, respectively) – are known to be universal precursors in biosynthesis of colored carotenoids in photosynthesizing organisms. It is commonly recognized that C<sub>40</sub> carotenoids are photoprotectors of cells and tissues. We have shown that phytofluene is an exception to this rule. By measuring photosensitized phosphorescence of singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) we found out that phytofluene was very effective photosensitizer of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> formation in aerated solutions under UVA irradiation (quantum yield of 85 ± 5%), whereas phytoene was almost inactive in this process. It was demonstrated that both carotenoids quench singlet oxygen in the dark. The obtained quenching rate constants [(4 ± 1) × 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup> for phytoene and (2 ± 0.5) × 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup> for phytofluene] were lower than the rate constant of the diffusion-controlled reactions by 3-4 orders of magnitude. Thus, both carotenoids displayed rather weak protector properties. Moreover, phytofluene due to its high photosensitizing activity might be considered as a promoter of cell photodamage and a promising UVA photosensitizer for medical purposes.

**Keywords:** phytofluene, phytoene, singlet oxygen, photosensitization, UVA