

УДК 577.3

## ВЛИЯНИЕ ДИПИРИДАМОЛА НА ЭНЕРГИЗАЦИЮ МЕМБРАН И ПРОЦЕССЫ МИГРАЦИИ ЭНЕРГИИ В ХРОМАТОФОРАХ *Rba. sphaeroides*

© 2022 П.П. Нокс<sup>1\*</sup>, Е.П. Лукашев<sup>1</sup>, Б.Н. Корватовский<sup>1</sup>, Н.Х. Сейфуллина<sup>1</sup>, С.Н. Горячев<sup>1</sup>, Э.С. Аллахвердиев<sup>2</sup>, В.З. Пашенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия, электронная почта: knox@biophys.msu.ru

<sup>2</sup> Российский национальный медицинский исследовательский центр кардиологии, 121552 Москва, Россия

Поступила в редакцию 07.06.2022

После доработки 24.08.2022

Принята к публикации 24.08.2022

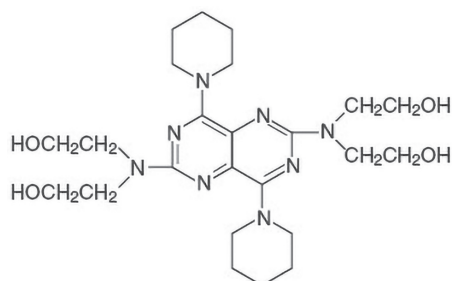
Исследовано влияние дипиридамола (ДИП) в концентрациях до 1 мМ на флуоресцентные характеристики светособирающих (LH2 и LH1) комплексов и на состояние фотосинтетической электрон-транспортной цепи в хроматофорах бактерий *Rhodobacter sphaeroides*. ДИП оказывает воздействие на эффективность переноса энергии от светособирающего комплекса LH2 к core-комплексу LH1 – реакционный центр и приводит к появлению длинноволнового («красного») сдвига полосы поглощения молекул светособирающего бактериохлорофилла в ИК-области спектра при 840–900 нм. Данный сдвиг связан с образованием энергизованного состояния мембраны. Показано, что ДИП способен восстанавливать фотоокисленный бактериохлорофилл реакционного центра. Это приводит к увеличению потока электронов по электрон-транспортной цепи и генерации трансмембранного потенциала на мембране хроматофора. Полученные результаты важны при анализе возможных механизмов влияния ДИП на активность мембранных функциональных белков. В частности, они могут иметь значение для интерпретации многочисленных терапевтических эффектов ДИП.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** хроматофоры, энергизация мембран, миграция энергии, дипиридамол.

DOI: 10.31857/S0320972522100098, EDN: BCGSCN

### ВВЕДЕНИЕ

Дипиридамол (ДИП) представляет собой модифицированный пурин-(2,6-бис(диэтиламино)-4,8-дипиридинопиридино(5,4-d)пиридин). Структурная формула молекулы показана ниже.



Этот препарат широко используется в медицине в качестве коронарного вазодилатора и антитромботического средства, тормозя агрегацию тромбоцитов. Предполагаемым механизмом его антитромботической активности является ингибирование активации тромбоцитов, ведущей к изменению их формы, что является начальным этапом их агрегации. Этот процесс осуществляется в результате воздействия ДИП на фосфодиэстеразу, регулирующую активационный путь передачи сигналов циклическими нуклеотидами (сGMP и сAMP) [1]. ДИП также служит эффективным ингибитором трансмембранного белка P-gp – АТФ-зависимой «помпы» липофильных соединений, выкачивающей из раковой клетки противоопухолевые лекарственные соедине-

Принятые сокращения: Бхл – бактериохлорофилл; ДИП – дипиридамол; ТМФД-Н<sub>2</sub> – восстановленный аскорбатом натрия N,N,N',N'-тетраметил-п-фенилендиамин; LH2, LH1 – светособирающие комплексы; P – фотоактивный бактериохлорофилл; Q<sub>A</sub> – первичный хинонный акцептор; Q<sub>B</sub> – вторичный хинонный акцептор; RC – реакционный центр.

\* Адресат для корреспонденции.

ния [2, 3]. Высказывались предположения, что ингибирование функции этого мембранного транспортёра может быть обусловлено прямым ингибированием мест связывания переносимых субстратов или нарушением сопряжённого процесса связывания и гидролиза АТФ [4]. ДИП способствует и множеству других биологических активностей, включая противовоспалительную, антиоксидантную и противовирусную. В связи с широким спектром фармакологической активности ДИП (сосудорасширяющей, антитромботической, противовоспалительной, антиоксидантной) существуют теоретические предпосылки к его применению в лечении пациентов с COVID-19 в качестве терапевтического средства. COVID-19 начинается как респираторная инфекция, но может сопровождаться состоянием гиперкоагуляции, тяжёлым воспалением из-за чрезмерного производства цитокинов и потенциально значительным окислительным стрессом [5, 6]. Однако, несмотря на длительное использование дипиридамола в медицине, детальные механизмы его многочисленных терапевтических эффектов до сих пор остаются неясными.

В наших предыдущих работах для изучения возможных механизмов взаимодействия ДИП с биологическими структурами мы исследовали влияние дипиридамола и его различных производных на процессы фотоиндуцированного переноса электронов и протонов в бактериальных фотосинтетических реакционных центрах (RC) пурпурных бактерий и в пурпурных мембранах галобактерий, содержащих бактериородопсин [7–9]. В этих исследованиях трансмембранные фоточувствительные белковые комплексы были использованы в качестве удобных информативных тест-систем для изучения молекулярных механизмов влияния ДИП на мембранные белки. Было показано, что в препаратах RC, изолированных из мембран *Rhodobacter sphaeroides*, ДИП вызывает ускорение темновой рекомбинации между фотоокисленным димером бактериохлорофилла (Бхл)  $P^+$  и восстановленным первичным хинонным акцептором  $Q_A^-$ . В мембранах хроматофоров этих бактерий дипиридамол замедляет скорость образования полностью восстановленного вторичного хинонного акцептора — гидрохинона  $Q_BH_2$ , переносящего восстановительные эквиваленты из белка RC в фотосинтетическую мембрану. Его влияние на фотоцикл бактериородопсина проявлялось в замедлении скорости распада M-интермедиа, сопряжённого с репротонированием основания Шиффа.

Как уже отмечено выше, ДИП также обладает антиоксидантными свойствами, ингибируя, в частности, перекисное окисление липидов за счёт способности к одно- и двух-электронному окислению [10–12]. Предположения о том, что терапевтические эффекты данного химического соединения могли бы быть связаны с его антиоксидантной способностью, высказаны, в частности, в работах Iuliano et al. [10] и Barzegar [13]. Влияние антиоксидантных агентов на белок P-gp было показано на примере ряда флавоноидов [14]. В работах Knox et al. [15, 16] мы показали возможность генерации катион-радикала ДИП как при его взаимодействии с изолированными белково-пигментными комплексами RC *Rba. sphaeroides*, так и с мембранами хроматофоров этих бактерий. Также в работе Knox et al. [16] мы высказали предположение о том, что вероятные электрон-донорные свойства ДИП являются предпосылкой для возможности генерации энергизованного состояния сопрягающих мембран.

Очевидно, что представляется актуальным дальнейшее детальное изучение влияния ДИП на состояние функциональных биологических мембран, на взаимодействия их интегральных компонентов. Целью данной работы явилось исследование эффектов ДИП на миграцию энергии от светособирающих белково-пигментных комплексов к фотосинтетическому RC бактерий *Rba. sphaeroides* и его электрон-донорных характеристик с использованием, в том числе, флуоресцентной и абсорбционной спектроскопии высокого временного разрешения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фотосинтетические мембраны хроматофоров из пурпурных несерных бактерий *Rba. sphaeroides* дикого типа выделяли из предварительно отмытых натрий-фосфатным буфером (100 мМ, pH 7,5) свежих клеток 5–6-дневной культуры. После ультразвуковой дезинтеграции клеток неразрушенные клетки и крупные частицы отделяли центрифугированием при 40 000 g в течение 15 мин, хроматофоры получали центрифугированием надосадочной жидкости при 144 000 g в течение 120 мин. Хроматофоры суспендировали в 20 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,5. Перед измерениями их разводили буфером до концентрации, соответствующей ~10 мкМ фотоактивного пигмента. Препараты обладают хорошей фотоиндуцированной электрон-транспортной активностью, хотя исходная циклическая скорость переноса электрона

в них невысокая. Последнее, очевидно, связано со значительной потерей водорастворимых подвижных переносчиков электрона – молекул цитохрома  $c_2$ .

Ввиду слабой растворимости ДИП в воде, которая существенно увеличивается в кислой области, рН «сток-раствора» ДИП в концентрации 20 мМ мы понижали до 4,5. Однако, поскольку буферная ёмкость раствора была достаточно высокой, то даже при максимальной концентрации ДИП 1 мМ, полученной при добавлении 50 мкл ДИП к 950 мкл хроматофоров, значение рН в образце практически не менялось.

В качестве экзогенного донора электронов использовали водный раствор ТМФД (N,N,N',N'-тетраметил-п-фенилендиамин, «Sigma», США) в концентрации от 1 мкМ до 1 мМ с аскорбатом натрия («Sigma»), который добавляли в концентрации на порядок выше концентрации ТМФД.

Спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра Hitachi-557 («Hitachi Ltd.», Япония), спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Fluorolog 3 («Horiba Jobin Yvon», Япония) с высокочувствительным в ИК-диапазоне охлаждаемым фотоумножителем Hamamatsu-5509 («Hamamatsu Photonics», Япония). Возбуждение флуоресценции осуществляли в полосе Соре поглощения порфириновых пигментов при 400 нм. Кинетики затухания флуоресценции измеряли методом счёта фотонов на длине волны 880 нм в режиме коррелированного счёта одиночных фотонов (TCSPC). Гибридный фотодетектор НРМ-100-07 («Becker&Hickl», Германия) обеспечивал аппаратную функцию системы регистрации около 16 пс. В качестве источника возбуждающего света использовали фемтосекундную лазерную систему «Тема-150» («Авеста-Проект», Россия), которая генерировала импульсы света с длиной волны излучения 400 нм, длительностью 300 фс и частотой повторения 80 МГц (средняя мощность излучения составляла 2,8 Вт, энергия отдельного лазерного импульса была равна 34 нДж). В экспериментах энергию возбуждающих импульсов света уменьшали с помощью нейтральных светофильтров до уровня, определяемого чувствительностью системы регистрации, при этом средняя плотность мощности излучения составляла  $3 \cdot 10^{-4}$  Вт/см<sup>2</sup>. Кинетики флуоресценции аппроксимировали в двухэкспоненциальном приближении.

Фотоиндуцированные изменения поглощения в области 740–920 нм при стационарном освещении регистрировали с шагом 10 нм на однолучевом дифференциальном спектрофо-

тометре с механической модуляцией света. Образец освещался в течение 5 с красным светом ( $\lambda > 620$  нм). Для построения по точкам разностного спектра поглощения типа «свет-минус-темнота» была использована программа Origin 8.1 («OriginLab», США) с функцией сглаживания «spline».

Изменения поглощения на одиночную вспышку (532 нм, длительность 7 нс, энергия импульса 10 мДж, YAG-Nd лазер LS-2131M («LOTIS ТП», Беларусь)) регистрировали на установке флеш-фотолиза с двойной монохроматизацией измеряющего света. С целью улучшения отношения сигнал/шум с помощью аналого-цифрового преобразователя OctopusCompuScope 8327 («GaGe», Канада) обычно проводили накопление от 50 до 100 одиночных сигналов. Для мультиэкспоненциальной аппроксимации кинетических кривых использовали программу Origin 8.1.

Все измерения повторяли минимум три раза, а результаты усредняли. Приводятся средние значения и стандартная ошибка.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

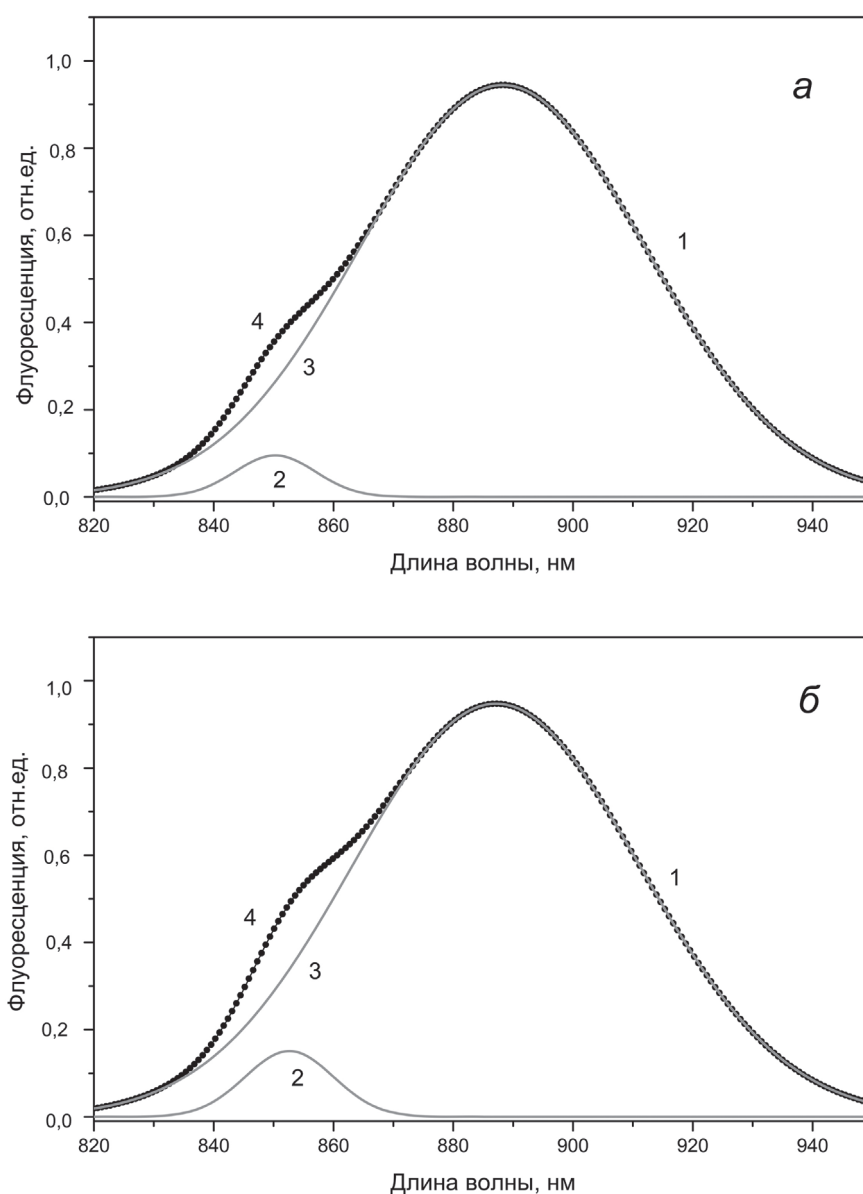
Фотосинтетический аппарат пурпурной бактерии *Rba. sphaeroides* содержит светособирающие комплексы двух типов – LH1 и LH2, комплексы реакционного центра цитохрома  $bc_1$  и АТФ-синтетазы [17]. В мембране RC и LH1 образуют комплекс LH1–RC, в котором каждый RC окружён кольцевой белковой структурой LH1, содержащей 32 связанных молекулы Бхл.  $Q_y$  полоса поглощения LH1 имеет максимум при 875 нм, максимум спектра флуоресценции этого комплекса находится при 885 нм. В отличие от LH1, в состав комплекса LH2 входят два спектрально различных типа молекул Бхл. Коротковолновую форму антенны образуют 9 молекул Бхл, поглощающих при 800 нм, остальные 18 молекул Бхл формируют более тесно связанную структуру, поглощающую при 850 нм. При возбуждении энергия от кольцевого комплекса Бхл 800 очень быстро переносится к кольцу комплекса Бхл 850, который способен флуоресцировать. Максимум спектра флуоресценции Бхл 850 находится при 860 нм [18].

Кинетика затухания флуоресценции хроматофоров, выделенных из клеток *Rba. sphaeroides*, выращенных в стандартных условиях, содержит, как правило, 3 компонента длительностью примерно 100 пс, 200–300 пс и 700–1000 пс [19, 20]. Авторы полагают, что быстрый компонент длительностью ~100 пс связан с захватом возбуждения от LH1, второй – либо

с миграцией энергии от LH2 к LH1, либо с рекомбинацией зарядов  $P^+H^-$  ( $P$  – фотоактивный димер Бхл,  $H$  – бактериофеофитин). Третий долгоживущий компонент относится к длительности флуоресценции не связанных с LH1 комплексов LH2. Отметим, что энергетическая связанность комплексов LH2 с LH1 определяет как длительность флуоресценции LH2, так и заселённость LH1-комплексов [21]. Подробный анализ кинетик затухания флуоресценции данных хромофоров приведён нами в работе Strakhovskaya et al. [22].

В спектрах поглощения контрольных образцов хромофоров *Rba. sphaeroides* и в при-

сутствии ДИП (0,25, 0,5 и 1 мМ) заметных различий обнаружено не было. Вместе с тем влияние ДИП проявляется в флуоресцентных характеристиках хромофоров. В контрольных образцах (рис. 1) основной максимум (~890 нм) обусловлен флуоресценцией комплекса LH1, который является акцептором энергии, поглощённой светособирающими пигментами LH2-комплекса хромофоров. Хорошо различимое плечо при ~855 нм является вкладом последнего в спектр испускаемой флуоресценции. На рис. 1 представлены спектры флуоресценции хромофоров и результаты их разложения на две гауссовы составляющие с максимумами

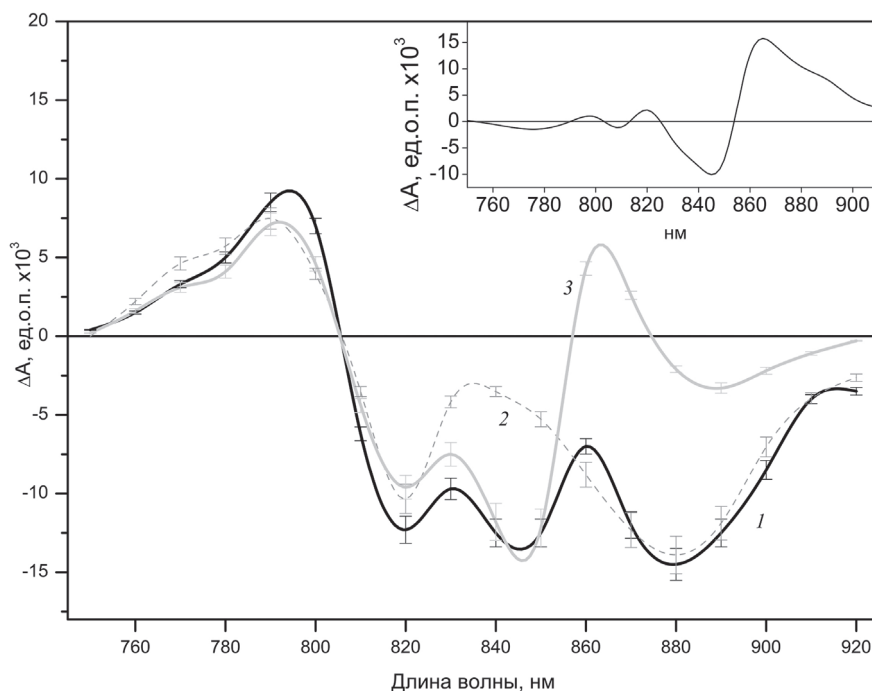


**Рис. 1.** Спектры флуоресценции суспензии хромофоров *Rba. sphaeroides* в контроле (а) и в присутствии 1 мМ ДИП (б). Оригинальные спектры (1, точки) были аппроксимированы суммой двух гауссовых компонент (4, сплошная чёрная кривая). Компонент с максимумом около 855 нм (2, серая сплошная кривая) принадлежит флуоресценции LH2-комплекса, а с максимумом около 890 нм (3, серая сплошная линия) – флуоресценции LH1-комплекса

при  $\sim 890$  и  $\sim 855$  нм, принадлежащие соответственно излучению LH1- и LH2-комплексов. Из сравнения спектров видно, что после добавления 1 мМ ДИП флуоресценция от LH2 увеличивается. Если в контрольном образце отношение площадей под гауссовыми компонентами спектров флуоресценции LH1 и LH2 составляло около 35, то в присутствии ДИП это значение уменьшалось до 20. Добавление ТМФД-Н<sub>2</sub> не приводило к изменениям спектров флуоресценции (данные не приводятся). Ещё более существенный рост интенсивности флуоресценции LH2 (и, соответственно, относительное уменьшение флуоресценции LH1) был обнаружен нами в недавней работе [22], в которой исследовалось влияние ряда катионных антисептиков на перенос энергии в таких же препаратах. Было показано, что это обусловлено нарушением функциональной связи между периферическими пигмент-белковыми комплексами LH2 и core-комплексами LH1–RC, что выражается в падении эффективности переноса энергии между ними. Очевидно, что сходный эффект, хотя и заметно менее выраженный, проявляется и при добавлении ДИП к хроматофорам *Rba. sphaeroides*.

Сохранение замкнутой везикулярной структуры мембран и системы энергетического сопряжения в хроматофорах *Rba. sphaeroides* позволяет исследовать не только электрон-транспортные процессы, но и преобразова-

ние поглощённой световой энергии в энергию трансмембранно разделённых зарядов. Так, сдвиги полос поглощения каротиноидов в спектральной области 400–500 нм возникают в ответ как на локальное разделение зарядов в RC, так и на появление трансмембранного поля, индуцирующего поляризацию белковой матрицы [23]. В то же время наблюдающийся в ИК-области спектра при 840–900 нм длинноволновый (так называемый «красный») сдвиг полосы поглощения молекул светособирающего Бхл отражает в основном образование энергизованного состояния мембраны хроматофора и не чувствителен к отдельным стадиям локального транспорта электрона по цепочке  $P \rightarrow Q_A \rightarrow Q_B$ . Эти изменения абсорбции наблюдались и в целых клетках различных видов пурпурных бактерий, и в хроматофорах, которые имели замкнутую везикулярную структуру, как у бактерий *Rhodospirillum rubrum*, *Rba. sphaeroides*, *Chromatium minutissimum* [24, 25]. Этот энергозависимый «красный» сдвиг поглощения Бхл наблюдался в условиях, когда трансмембранный перенос электронов сопровождался антибатным транспортом протонов в виде восстановленного вторичного гидрохинона в результате работы так называемого Q-цикла с участием цитохром *bc<sub>1</sub>*-оксидоредуктазного комплекса. При добавлении в среду экзогенного донора электронов (2,6-дихлорфенолиндофенола с избытком аскорбата) происходило



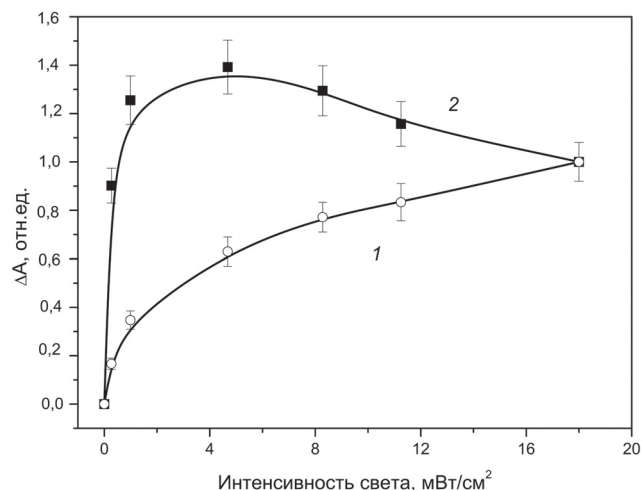
**Рис. 2.** Дифференциальные спектры «свет-минус-темнота» хроматофоров *Rba. sphaeroides* в контроле (1), в присутствии 10 мМ ингибитора переноса электронов о-фенантролина (2) и в присутствии 1 мМ ДИП (3). На вставке показана разность «спектр 3-минус-спектр 2» после их нормирования при 790 нм

усиление этого красного сдвига за счёт активации циклического транспорта электронов на стационарном свете в тех RC, где отсутствует экзогенный донор электронов – цитохром  $c_2$ .

В то же время блокирование электронного транспорта на участке между первичным и вторичным хинонными акцепторами с помощью специфического ингибитора о-фенантролина привело к их полному подавлению [26].

Разностные спектры поглощения «свет-минус-темнота» хромофоров бактерий *Rba. sphaeroides* в контроле (1), а также в присутствии ингибитора переноса электронов о-фенантролина (2) и ДИП (3) приведены на рис. 2. Спектр контрольного образца в ближней ИК-области имеет положительный максимум при 790 нм и три отрицательных максимума при 820, 840 и 880 нм. Такой вид спектра свидетельствует, что нативность мембран хромофоров не нарушена, и что под влиянием появляющейся на мембране разности потенциалов возникает «красный» сдвиг полосы светособирающего Бхл. Поскольку экзогенный донор электронов не добавлялся, циклическая активность фотосинтетического аппарата оказалась, очевидно, невысокой, и положительных изменений в области 850–900 нм не наблюдалось. При блокировании транспорта электрона о-фенантролином сохраняются лишь те изменения поглощения, которые отражают фотоокисление Р, характеризующиеся выцветанием полосы при 870 нм и сопутствующим коротковолновым сдвигом полосы поглощения мономерного Бхл при 800 нм, с дифференциальными максимумами при 790 нм и минимумом при 820 нм (рис. 2, кривая 2).

Добавление ДИПw вызывало стимуляцию энергозависимых абсорбционных изменений. В дифференциальном спектре поглощения в области 850–900 нм наблюдалось появление положительных изменений в спектре поглощения с максимумом около 860 нм за счёт суперпозиции изменений, связанных с окислительно-восстановительными переходами редокс-компонентов RC (фотоактивный Бхл → хинонные акцепторы) и изменений, отражающих действие внешнего трансмембранного поля на молекулы светособирающего Бхл. Это подтверждается сложной кинетикой разнонаправленных фотоиндуцированных изменений поглощения в этой области после выключения активирующего света, указывающей на существование более медленно релаксирующих «положительных» и более быстрых «отрицательных» абсорбционных изменений. Первые, очевидно, связаны с «красным» сдвигом антенны, а вторые – с окислительно- восстано-



**Рис. 3.** Зависимость от интенсивности света амплитуды фотоиндуцированных изменений поглощения в хромофорах *Rba. sphaeroides* в присутствии 1 мМ ДИП при 790 нм (1), отражающих окислительно-восстановительные превращения фотоактивного Бхл Р, и изменений поглощения при 860 нм (2), в области их суперпозиции с энергозависимым красным сдвигом полосы 850 нм

вительными превращениями Бхл Р. Световые кривые, измеренные в спектральной области, характерной для абсорбционных изменений только второго типа (например, при 790 нм) и в области, где наблюдается суперпозиция изменений обоих типов (около 860 нм), также подтверждают данный вывод (рис. 3). Из рис. 3 следует, что положительные фотоиндуцированные изменения поглощения, связанные с длинноволновым сдвигом полосы Бхл под действием разделённых зарядов, имеют более низкую область светового насыщения, чем отрицательные изменения поглощения, обусловленные выцветанием фотоактивного Бхл Р. Напомним, что напряжённость поля на мембране может достигать величины порядка  $10^8$  В/м [27].

Вычитая из спектра 3 на рис. 2 спектр 2, получим разностный спектр для потенциал-зависимых изменений поглощения. Это показано на вставке к рис. 2. Структура разностного спектра свидетельствует о том, что в условиях энергизации мембран хромофоров происходит длинноволновый сдвиг полосы поглощения светособирающей антенны молекул Бхл при 850 нм.

Как уже отмечено выше, у бактерий *Rba. sphaeroides* существует два антенных комплекса: LH2 – молекулы с максимумами поглощения при 800 и 850 нм (Бхл 800 и Бхл 850) и LH1 с максимумом поглощения при 870 нм (Бхл 870). Согласно данным рентгеноструктурного анализа [28, 29], молекулы Бхл 850 находятся в существенно гидрофобном окружении, тесно упакованы и ориентированы плоскостями своих порфириновых колец перпендикулярно к

плоскости мембраны хромофора. В то же время мономерные молекулы Бхл 800 располагаются между внешними спиралями белкового носителя, ориентированы параллельно плоскости мембраны и взаимодействуют с полярной средой. Очевидно, перпендикулярная ориентация молекул Бхл 850 к плоскости мембраны и низкая диэлектрическая постоянная их мембранного окружения и являются главными причинами того, что именно эти молекулы в поле высокой напряжённости испытывают длинноволновый электрохромный сдвиг полосы поглощения (Штарк-эффект) при образовании разности потенциалов на мембране.

Влияние ДИП на энергизацию мембран хромофоров можно объяснить, полагая, что этот агент способен отдавать электроны фотоокисленному Р, как это делают, например, редокс-медиаторы 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ) или ТМФД в присутствии аскорбата натрия. Их стимулирующее действие на процесс энергизации мембран хромофоров известно давно [25] и заключается в усилении циклического транспорта электронов за счёт их притока от восстановленной формы ТМФД на фотоокисленный пигмент Р. Регистрируемая при этом скорость темнового восстановления Р<sup>+</sup> увеличивается.

На рис. 4 показаны кинетические кривые фотоиндуцированных изменений поглощения в хромофорах при 790 нм (в полосе-индикаторе окислительно-восстановительных превращений) в контроле и при добавлении ТМФД-Н<sub>2</sub> или ДИП.

Видно, что темновое восстановление пигмента существенно ускоряется в обоих случаях, что подтверждает предположение об электрон-донорных свойствах ДИП. Однако эти свойства у ДИП выражены существенно слабее. Максимальный эффект ускорения кинетики в присутствии ДИП достигается при концентрации 1 мМ. При дальнейшем росте концентрации ДИП скорость темнового восстановления Р<sup>+</sup> уже не увеличивается. Следует отметить, что «красный» сдвиг полосы БХл 850, регистрируемый при освещении постоянным светом как положительные изменения абсорбции при 860 нм, также достигает максимума при концентрации ДИП 1 мМ. ТМФД-Н<sub>2</sub> является гораздо более эффективным донором электронов. Близкий к действию ДИП эффект ускорения кинетики достигается уже при концентрации ТМФД-Н<sub>2</sub> около 1 мкМ, а при дальнейшем увеличении его концентрации до 1 мМ константа скорости восстановления Р<sup>+</sup> увеличивается существенным образом (рис. 5).

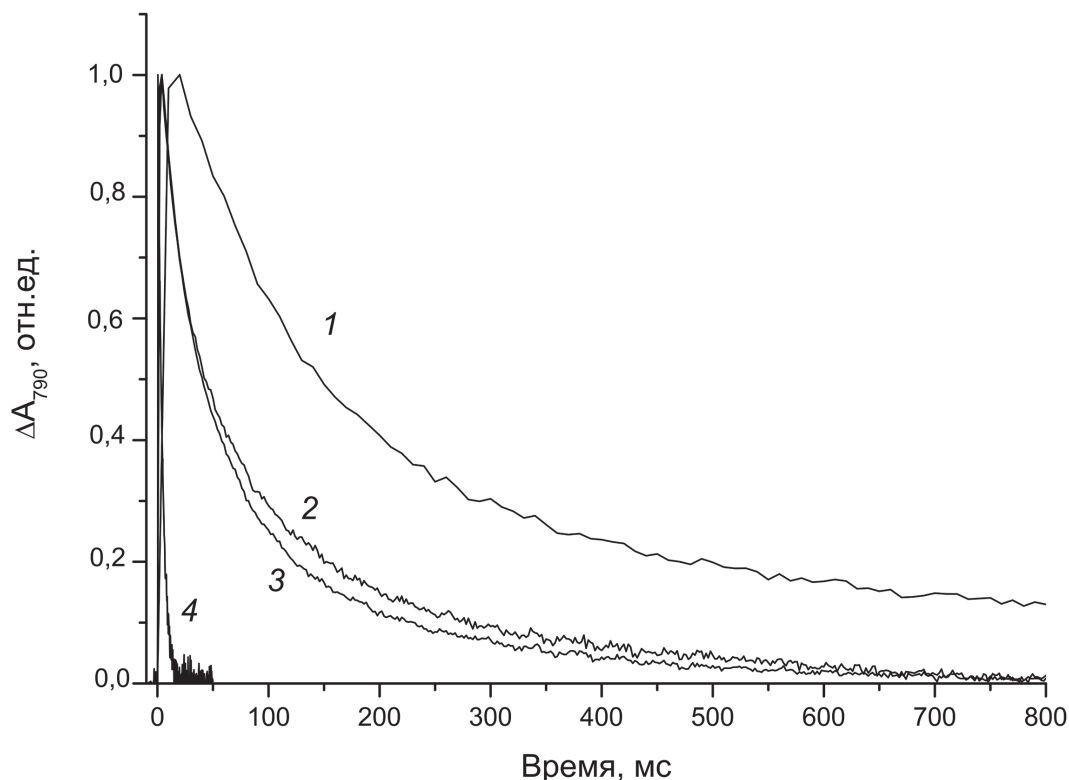
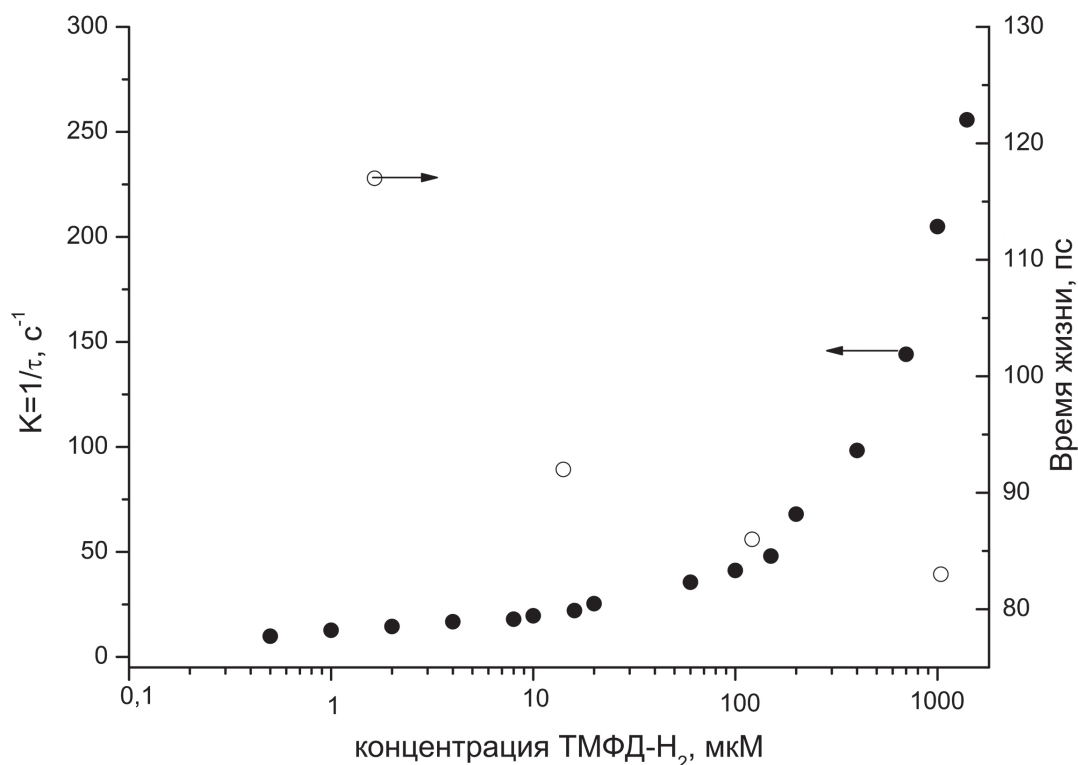


Рис. 4. Кинетика темнового восстановления Р<sup>+</sup> в хромофорах *Rba. sphaeroides* после активации одиночной лазерной вспышкой (532 нм, 7 нс) в контроле (1), а также в присутствии 1 мМ ДИП (2) и ТМФД-Н<sub>2</sub> в концентрации 1 мкМ (3) и 1 мМ (4)



**Рис. 5.** Зависимость константы скорости темнового восстановления  $P^+$  в хромофорах *Rba. sphaeroides* (чёрные кружки) от концентрации ТМФД-Н<sub>2</sub> после световой активации лазерной вспышкой (532 нм, 7 нс). Для расчётов использовали время, за которое светоиндуцированное изменение абсорбции уменьшалось в 2,7 раз. На рисунке также показана зависимость от концентрации ТМФД-Н<sub>2</sub>  $\tau$  короткого компонента флуоресценции БХл (открытые кружки), имеющего амплитуду порядка 95%

Мы также исследовали изменение времени жизни флуоресценции в хромофорах *Rba. sphaeroides* при добавлении ДИП и ТМФД-Н<sub>2</sub>: рис. 6, таблица (времена жизни и амплитуды кинетики затухания флуоресценции в таблице приводятся в двухэкспоненциальном приближении).

Как видно из рис. 6, наблюдается ускорение этой кинетики как при добавлении ДИП,

так и при добавлении ТМФД-Н<sub>2</sub>. Объясняется это следующим. Хотя мы использовали очень низкую интенсивность возбуждающего света, при использованной нами частоте фотовозбуждения препаратов 80 МГц, когда световые импульсы следуют через 12,5 нс, часть фотоактивного пигмента в хромофорах постоянно оказывается в окисленном состоянии (поскольку, как отмечалось выше, исходная цикличе-

Времена жизни ( $\tau$ , пс) и амплитуды ( $a$ , %) кинетических компонентов флуоресценции\* хромофоров *Rba. sphaeroides* в контроле и в присутствии ДИП и ТМФД-Н<sub>2</sub> в различных концентрациях

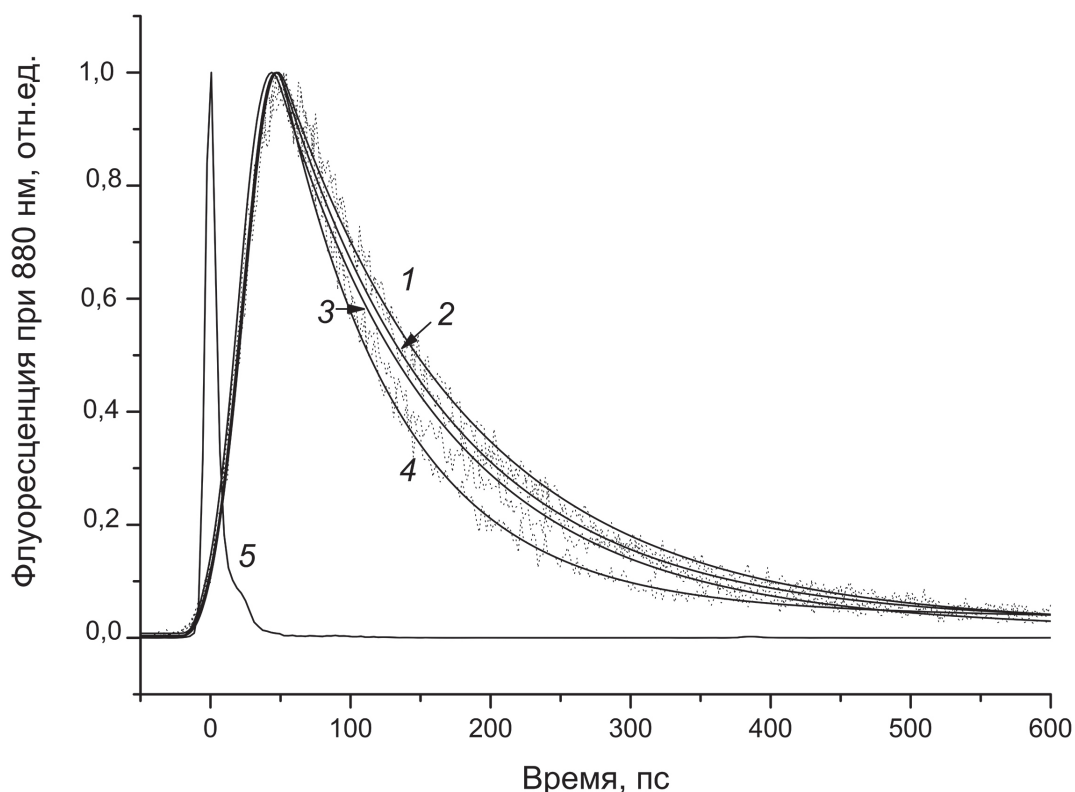
Хромофоры *Rba. sphaeroides*

Время жизни	Контроль	+ДИП, 0,1 мМ	+ДИП, 0,5 мМ	+ДИП, 1 мМ	+ТМФД, 1 мкМ	+ТМФД, 10 мкМ	+ТМФД, 100 мкМ	+ТМФД, 1 мМ
$\tau_1$	131 ± 6	125 ± 5	123 ± 5	112 ± 4	117 ± 6	92 ± 6	86 ± 5	83 ± 4
$\tau_2$	581 ± 17	602 ± 15	597 ± 15	616 ± 14	767 ± 15	873 ± 16	878 ± 14	889 ± 14
$a_1$	96,0 ± 4,3	95,2 ± 4,7	94,2 ± 3,5	93,9 ± 4,4	95,2 ± 5,1	95,1 ± 4,6	95,2 ± 3,9	94,9 ± 5,3
$a_2$	4,0 ± 0,8	4,8 ± 1,1	5,8 ± 0,9	6,1 ± 0,4	4,8 ± 0,9	4,9 ± 0,7	4,8 ± 0,6	5,1 ± 1,0

\* Приведены средние значения по трём измерениям и стандартная ошибка.

$\lambda_{\text{возб.}} = 400 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{рег.}} = 880 \text{ нм}$





**Рис. 6.** Кинетика затухания флуоресценции в хромофорах *Rba. sphaeroides* в контроле (1), в присутствии 1 мМ ДИП (2), а также ТМФД-Н<sub>2</sub> в концентрации 1 мкМ (3) и 1 мМ (4). Кривая 5 — аппаратная функция ~16 пс. Точки — экспериментальные данные, сплошные линии — результат двухэкспоненциальной аппроксимации

ская активность фотосинтетического аппарата, регистрируемая по «красному» сдвигу, невысокая). Добавление внешнего донора электронов ТМФД-Н<sub>2</sub> увеличивает уровень восстановленности фотоактивного Бхл в ходе данных кинетических измерений.

Известно, что длительность флуоресценции антенных комплексов LH1 существенным образом зависит от состояния фотоактивного пигмента RC. В образцах с восстановленным RC длительность флуоресценции составляет ~80 пс. В случае окисленных RC длительность быстрого компонента кинетики затухания флуоресценции увеличивается до ~200 пс. Как видно из кинетик, приведённых на рис. 6, при добавлении ДИП и ТМФД-Н<sub>2</sub> поглощаемая световая энергия эффективнее используется в фотохимических реакциях в RC, и регистрируемое время флуоресценции сокращается. Причём, если сравнивать действие ДИП и ТМФД-Н<sub>2</sub> на длительность флуоресценции для концентраций, сопоставимых по ускорению восстановления P<sup>+</sup> (1 мМ и 1 мкМ соответственно), то можно утверждать, что эффекты очень близки. Однако, как и в случае абсорбционных измерений при более высоких концентрациях ТМФД-Н<sub>2</sub>, τ быстрого компонента кинетики флуоресценции продолжает

уменьшаться (рис. 6). Экстраполяция зависимостей, показанных на рис. 6, даёт величину около 80 пс. Исходя из литературных данных и результатов этой работы, мы полагаем, что величина 80 пс — это время захвата энергии возбуждения в LH1-комплексе реакционным центром, фотоактивный пигмент которого находится в восстановленной форме.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Следует отметить факт того, что, наряду с демонстрируемым выше ускорением доставки световой энергии (на ~10%) к фотоактивному пигменту RC в присутствии ДИП (рис. 6), одновременно наблюдается и определённое снижение эффективности переноса энергии от комплексов LH2 к LH1-RC. На это указывает рост в ~1,7 раза интенсивности флуоресценции LH2-комплекса с максимумом при 855 нм в стационарном спектре флуоресценции (рис. 1) и синхронное увеличение в ~1,6 раза вклада медленного (сотни пикосекунд) компонента кинетики затухания свечения, регистрируемого при 860 нм, который отражает собственную флуоресценцию LH2 (данные не показаны). К такому же выводу можно прийти, если срав-

нить вклады от медленного компонента кинетики затухания флуоресценции контрольных образцов и препаратов с добавлением 1 мМ ДИП, регистрируемых в полосе 880 нм (таблица). Важно отметить, что при добавлении ТМФД-Н<sub>2</sub> происходит только уменьшение времени жизни быстрого, порядка 100 пс, компонента, а соотношение амплитуд двух фаз практически не изменяется. Возможно, ДИП вызывает определённые нарушения пространственной упаковки липидов, приводящие к изменениям взаимного расположения комплексов LH2 и LH1-RC. Подобный эффект ранее мы обнаружили при воздействии на фотосинтетическую мембрану *Rba. sphaeroides* катионных антисептиков [22]. Данное сходство, возможно, связано с похожим модифицирующим воздействием этих антисептиков и ДИП на биомембрану. Для эффекта катионных антисептиков важны зарядовые взаимодействия с поверхностью мембраны, происходящие благодаря разнесённым в пространстве положительным зарядам на атомах азота в структуре молекул. В случае молекулы ДИП в используемых условиях также генерируется катион-радикал с локализуемыми на атомах азота положительными зарядами.

Обсуждая электрон-донорные возможности ДИП, отметим, что механизм окисления ДИП до сих пор является предметом дискуссий. Для вольтамперометрического окисления ДИП в водном растворе в работе Tabak et al. [30] рассматриваются два последовательных процесса, контролируемых одноэлектронной диффузией, или одностадийное окисление с участием двух электронов. Стехиометрия анодного окисления ДИП в водном растворе отвечает отрыву двух электронов от каждой молекулы ДИП, что сопровождается освобождением одного протона на окисляемую молекулу [31]. В работе David et al. [32] предполагается, что в результате электроокисления ДИП происходит реорганизация пиперидиновых колец, приводящая к появлению положительного заряда на их атомах азота. Донирование электронов молекулой ДИП в электрон-транспортную цепь кофакторов RC сопровождается образованием восстановленного гидрохинона (хинола) Q<sub>B</sub>-H<sub>2</sub>. Последний уходит в мембрану, быстро замещаясь убихиноном-10 из мембранного пула, размер которого составляет 20–30 молекул убихинона на один RC [33, 34]. Мембранный комплекс цитохрома bc<sub>1</sub> при окислении убихинола в присутствии молекулярного кислорода может продуцировать появление аниона супероксида [35]. Сопутствующее такой реакции поглощение мо-

лекулярного кислорода мембранами хромофоров пурпурных бактерий в условиях циклического транспорта электрона было показано уже давно [36]. Появляющийся в мембране супероксид может реагировать с ДИП. Последнее было продемонстрировано нами на препаратах изолированных RC, способных генерировать супероксидный радикал при освещении постоянным светом [37]. Тушение свободных радикалов молекулой ДИП могло бы быть связано, в том числе, с сопряжённым с отрывом электрона переносом протона от различных атомов азота [13].

Согласно современным представлениям [38], в ходе полного реакционного цикла, осуществляемого цитохромным bc<sub>1</sub>-комплексом, две молекулы хинола окисляются до двух молекул хинона в Q<sub>o</sub>-сайте комплекса на стороне мембраны, противоположной месту локализации хинонного акцепторного участка RC. Далее, два электрона из четырёх из Q<sub>o</sub>-сайта могут восстанавливать подвижный переносчик электронов для фотоокисленного P<sup>+</sup> – цитохром c<sub>2</sub>, а другие два электрона восстанавливают 1 молекулу хинона из мембранного пула до хинола в Q<sub>i</sub>-сайте комплекса на другой стороне мембраны. Последнее сопровождается дополнительно поглощением двух протонов из среды. При наличии молекулярного кислорода он легко диффундирует внутрь цитохромного bc<sub>1</sub>-комплекса, где в Q<sub>o</sub>-сайте в побочной реакции может восстанавливаться до супероксида [38]. Также сам молекулярный кислород может принимать атом водорода от молекулы хинола [35], продуцируя протонированный супероксид (O<sub>2</sub> H), который, диффундируя далее в водную фазу, генерирует супероксид при депротонировании.

В нашем случае перенос электронов на кислород, сопровождаемый протонированием появляющегося супероксида молекулами ДИП, возможно, является одним из источников наблюдаемой при активации хромофоров постоянным светом энергизации фотосинтетической мембраны в результате поглощения и трансмембранного перемещения протонов функционирующим цитохромным bc<sub>1</sub>-комплексом. Вероятно также, что электрон-донорная способность ДИП приводит к активации индуцируемого светом циклического транспорта с участием водорастворимых подвижных молекул цитохрома c<sub>2</sub>. Последние частично теряются в ходе препаративной процедуры выделения хромофоров [39]. Очевидно, поэтому в исходных препаратах хромофоров циклическая активность невысокая (рис. 2, кривая 1).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты данного исследования подтверждают, что обсуждаемые в литературе возможности влияния ДИП на взаимодействия мембранных белков и его электрон-донорные свойства могут оказывать реальное воздействие на активность функциональных мембранных белков. Это является дополнительным аргументом для учёта таких возможностей при изучении механизмов терапевтических эффектов ДИП, в том числе, включая его воздействие на активность трансмембранного белка P-gp, обеспечивающего множественную лекарственную устойчивость опухолей.

**Вклад авторов.** П.П. Нокс, Е.П. Лукашев, В.З. Пашенко – постановка задач, обсуждение результатов, написание текста; Е.П. Лукашев, Б.Н. Корватовский, С.Н. Горячев, Е.С. Аллахвердиев – проведение экспериментов, обработка результатов; Н.Х. Сейфуллина – приготовление препаратов для исследований.

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

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

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jensen, B. O., Kleppe, R., Kopperud, R., and Nygaard, G. (2010) Dipyridamole synergizes with nitric oxide to prolong inhibition of thrombin-induced platelet shape change, *Platelets*, **22**, 8-19, doi: 10.3109/09537104.2010.517581.
- Shalinsky, D. R., Andreef, M., and Howell, S. B. (1990) Modulation of drug sensitivity by dipyridamole in multidrug resistant tumor cells *in vitro*, *Cancer Res.*, **50**, 7537-7543.
- Iuliano, L., Colavita, A. R., Leo, R., Praticò, D., and Violi, F. (1997) Oxygen free radicals and platelet activation, *Free Radic. Biol. Med.*, **22**, 999-1006, doi: 10.1016/s0891-5849(96)00488-1.
- Wessler, J. D., Grip, L. T., Mendell, J., and Giugliano, R. P. (2013) The P-glycoprotein transport system and cardiovascular drugs, *J. Americ. Coll. Cardiol.*, **61**, 2495-2502, doi: 10.1016/j.jacc.2013.02.058.
- Aliter, K. F., and Al-Horani, R. A. (2021) Potential therapeutic benefits of dipyridamole in COVID-19 patients, *Curr. Pharm. Des.*, **27**, 866-875, doi: 10.2174/1381612826666201001125604.
- Liu, X., Li, Z., Liu, S., Sun, J., Chen, Z., et al. (2020) Potential therapeutic effects of dipyridamole in the severely ill patients with COVID-19, *Acta Pharm. Sin. B*, **10**, 1205-1215, doi: 10.1016/j.apsb.2020.04.008.
- Knox, P. P., Churbanova, I. Yu., Lukashev, E. P., Zakharova, N. I., Rubin, A. B., et al. (2000) Dipyridamole and its derivatives modify the kinetics of the electron transport in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Photochem. Photobiol.*, **56**, 68-77, doi: 10.1016/s1011-1344(00)00062-2.
- Knox, P. P., Lukashev, E. P., Mamedov, M. D., Semenov, A. Yu., Seifullina, N. Kh., et al. (2000) Slowing of proton transport processes in the structure of bacterial reaction centers and bacteriorhodopsin in the presence of dipyridamole, *Biochemistry (Moscow)*, **65**, 213-217.
- Knox, P. P., Lukashev, E. P., Mamedov, M. D., Semenov, A. Yu., and Borissevitch, G. P. (2001) Proton transfer in bacterial reaction centers and bacteriorhodopsin in the presence of dipyridamole, *Prog. React. Kinet. Mech.*, **26**, 287-298, doi: 10.3184/007967401103165217.
- Iuliano, L., Pratico, D., Ghiselli, A., Bonavita, M. S., and Violi, F. (1992) Reaction of dipyridamole with the hydroxyl radical, *Lipids*, **27**, 349-353, doi: 10.1007/BF02536149.
- Nepomuceno, M. F., Alonso, A., Pereira-Da-Silva, L., and Tabak, M., (1997) Inhibitory effect of dipyridamole and its derivatives on lipid peroxidation in mitochondria, *Free Radic. Biol. Med.*, **23**, 1046-1054, doi: 10.1016/s0891-5849(97)00135-4.
- Almeida, L. E., Castilho, M., Mazo, L. H., and Tabak, M. (1998) Voltammetric and spectroscopic studies of the oxidation of the anti-oxidant drug dipyridamole in acetonitrile and ethanol, *Anal. Chim. Acta*, **375**, 223-231, doi: 10.1016/S0003-2670(98)00501-7.
- Barzegar, A. (2012) Proton-coupled electron-transfer mechanism for the radical scavenging activity of cardiovascular drug dipyridamole, *PLoS One*, **7**, e39660, doi: 10.1371/journal.pone.0039660.
- Galati, G., and O'Brien, P. J. (2004) Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties, *Free Radic. Biol. Med.*, **37**, 287-303, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.034.
- Knox, P. P., Timofeev, K. N., Gorokhov, V. V., Seifullina, N. Kh., and Rubin, A. B. (2017) Generation of radical form of dipyridamole at illumination of photosynthetic reaction centers of *Rb. sphaeroides*,

- Dokl. Biochem. Biophys.*, **473**, 118-121, doi: 10.1134/S1607672917020089.
16. Knox, P. P., Lukashov, E. P., Seyfullina, N. Kh., Gorokhov, V. V., and Rubin, A. B. (2017) The influence of dipyridamole and its derivatives on the membrane energization state of *Rhodobacter sphaeroides* bacterial chromatophores, *Biophysics*, **62**, 734-741, doi: 10.1134/S0006350917050153.
  17. Cartron, M. L., Olsena, J. D., Sener, M., Jackson, P. J., Brindley, A. A., et al. (2014) Integration of energy and electron transfer processes in the photosynthetic membrane of *Rhodobacter sphaeroides*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1769-1780, doi: 10.1016/j.bbabi.2014.02.003.
  18. Sundström, V., Pullerits, T., and van Grondelle, R. (1999) Photosynthetic light harvesting: reconciling dynamics and structure of purple bacterial LH2 reveals function of photosynthetic unit, *J. Phys. Chem. B*, **103**, 2327-2346, doi: 10.1021/jp983722+.
  19. Freiberg, A., Allen, J. P., Williams, J. A. C., and Woodbury, N. W. (1996) Energy trapping and detrapping by wild type and mutant reaction centers of purple non-sulfur bacteria, *Photosyn. Res.*, **48**, 309-319, doi: 10.1007/BF00041022.
  20. Driscoll, B., Lunceford, C., Lin, S., Woronowicz, K., Niederman, R. A., and Woodbury, N. W. (2014) Energy transfer properties of *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores during adaptation to low light intensity, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **16**, 17133-17141, doi: 10.1039/C4CP01981D.
  21. Caycedo-Soler, F., Rodrigez, F. J., Quiroga, L., Zhao, G., and Johnson, N. F. (2011) Energy conversion in purple bacteria photosynthesis, in *Photosynthesis* (Najafpour, M., ed.) INTECH, London, pp. 1-27, doi: 10.5772/26241.
  22. Strakhovskaya, M. G., Lukashov, E. P., Korvatovskiy, B. N., Kholina, E. G., Seifullina, N. Kh., et al. (2021) The effect of some antiseptic drugs on the energy transfer in chromatophore photosynthetic membranes of purple non-sulfur bacteria *Rhodobacter sphaeroides*, *Photosyn. Res.*, **147**, 197-209, doi: 10.1007/s11120-020-00807-x.
  23. Andersson, P. O., Gillbro, T., Ferguson, L., and Cogdell, R. J. (1990) Spectral shift of purple bacterial carotenoids related to solvent and protein polarizability, in *Current Research in Photosynthesis* (Baltshcheyfsky, M., ed.) Vol. II, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 117-120.
  24. Vredenberg, V. J., and Ames, J. (1966) Absorption bands of bacteriochlorophyll types in purple bacteria and their response to illumination, *Biochim. Biophys. Acta*, **126**, 244-261, doi: 10.1016/0926-6585(66)90060-4.
  25. Barsky, E. L., and Samuilov, V. D. (1979) Blue and red shifts of bacteriochlorophyll absorption band around 880 nm in *Rhodospirillum rubrum*, *Biochim. Biophys. Acta*, **548**, 448-457, doi: 10.1016/0005-2728(79)90057-4.
  26. Kononenko, A. A., Venediktov, P. S., Chemeris, Yu. K., Adamova, N. P., and Rubin, A. B. (1974) Relation between electron transport-linked processes and delayed luminescence in photosynthesizing bacteria, *Photosynthetica*, **8**, 176-183.
  27. Junge, W. (1977) Membrane potentials in photosynthesis, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **28**, 503-536, doi: 10.1146/annurev.pp.28.060177.002443.
  28. McDermot, G., Prince, S. M., Freer, A. A., Hawthornthwaite-Lawless, A. M., Papiz, M. Z., et al. (1995) Crystal-structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria, *Nature*, **374**, 517-521, doi: 10.1038/374517a0.
  29. Poszak, A. W., Howard, T. D., Soutal, J., Gurdiner, A. T., Low, C. J., et al. (2003) Crystal structure of the RC-LH1 core complex from *Rhodospseudomonas palustris*, *Science*, **302**, 1969-1972, doi: 10.1126/science.1088892.
  30. Tabak, M., Castilho, M., Almeida, L. E., and Mazo, L. H. (1998) Voltammetric studies of dipyridamole oxidation in aqueous micellar solutions, *Free Radic. Biol. Med.*, **25**, S40, doi: 10.1016/s0891-5849(98)90119-8.
  31. Castilho, M., Almeida, L. E., Tabak, M., and Mazo, L. H. (2000) Voltammetric oxidation of dipyridamole in aqueous acid solutions, *J. Braz. Chem. Soc.*, **11**, 148-153, doi: 10.1590/S0103-50532000000200008.
  32. David, I. G., Iordache, L., Popa, D. E., Buleandra, M., David, V., et al. (2019) Novel voltammetric investigation of dipyridamole at a disposable pencil graphite electrode, *Turk. J. Chem.*, **43**, 1109-1122, doi: 10.3906/kim-1903-64.
  33. Crofts, A. R., and Wraight, C. A. (1983) The electrochemical domain of photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **726**, 149-185, doi: 10.1016/0304-4173(83)90004-6.
  34. Mezzettia, A., Leibla, W., Breton, J., and Nabedryk, E. (2003) Photoreduction of the quinone pool in the bacterial photosynthetic membrane: identification of infrared marker bands for quinol formation, *FEBS Lett.*, **537**, 161-165, doi: 10.1016/s0014-5793(03)00118-2.
  35. Yin, Y., Yang, S., Yu, L., and Yu, C.-A. (2010) Reaction mechanism of superoxide generation during ubiquinol oxidation by the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex, *J. Biol. Chem.*, **285**, 17038-17045, doi: 10.1074/jbc.M110.104364.
  36. Remennikov, V. G., and Samuilov, V. D. (1980) Interaction of photosynthetic electron transport chain components *Rhodospirillum rubrum* with oxygen, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **252**, 491-494.
  37. Knox, P. P., Lukashov, E. P., Timofeev, K. N., and Seifullina, N. Kh. (2002) Effects of oxygen on the dark recombination between photoreduced secondary quinone and oxidized bacteriochlorophyll in *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers, *Biochemistry (Moscow)*, **67**, 901-907, doi: 10.1023/a:1019966620850.

38. Husen, P., and Solov'yov, I. A. (2016) Spontaneous binding of molecular oxygen at the Q<sub>o</sub>-site of the bcl complex could stimulate superoxide formation, *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 12150-12158, doi: 10.1021/jacs.6b04849.
39. Michels, P. A. M., and Konings, W. N. (1978) Structural and functional properties of chromatophores and membrane vesicles from *Rhodospirillum rubrum*, *Biochim. Biophys. Acta*, **507**, 353-368, doi: 10.1016/0005-2736(78)90346-2.

## THE EFFECTS OF DIPYRIDAMOLE ON MEMBRANE ENERGIZATION AND ENERGY MIGRATION PROCESSES IN THE *Rba. sphaeroides* CHROMATOPHORES

P. P. Knox<sup>1\*</sup>, E. P. Lukashev<sup>1</sup>, B. N. Korvatovskiy<sup>1</sup>, N. Kh. Seifullina<sup>1</sup>, S. N. Goryachev<sup>1</sup>, E. S. Allakhverdiev<sup>2</sup>, and V. Z. Paschenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Biophysics Department, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: knox@biophys.msu.ru*

<sup>2</sup> *Russian National Medical Research Center of Cardiology, 121552 Moscow, Russia*

The effect of dipyrindamole (DIP) at concentrations up to 1 mM on the fluorescent characteristics of the light-harvesting complexes LH2 and LH1, as well as on their interaction and on the state of the photosynthetic electron transport chain in the chromatophores of bacteria *Rba. sphaeroides* was studied. DIP affects the efficiency of energy transfer from the light-harvesting complex LH2 to the core complex LH1-reaction center and leads to the appearance of a long-wave ("red") shift of the absorption band of light-harvesting bacteriochlorophyll molecules in the IR region of the spectrum at 840-900 nm. This shift is associated with the formation of an energized state of the membrane. It is shown that DIP is able to reduce the photo-oxidized bacteriochlorophyll of the reaction center and this ability leads to an increase in the flow of electrons along the electron transport chain and, thus, stimulates the generation of transmembrane potential on the chromatophore membrane. The results obtained are important in analyzing the possible mechanisms of the influence of DIP on the activity of membrane functional proteins. In particular, they may be important for the interpretation of the numerous therapeutic effects of DIP.

*Keywords:* chromatophores, membrane energization, energy migration, dipyrindamole