

ξ-КАРОТИН: ГЕНЕРАЦИЯ И ТУШЕНИЕ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА, СРАВНЕНИЕ С ФИТОФЛУИНОМ

© 2022 А.А. Ашихмин¹, А.С. Бендиксис², А.А. Москаленко¹, А.А. Красновский (мл.)^{2*}

¹ ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 142290 Пушкино, Московская обл., Россия

² ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биохимии имени А.Н. Баха,
119071 Москва, Россия; электронная почта: phoal@mail.ru

Поступила в редакцию 29.05.2022

После доработки 24.08.2022

Принята к публикации 24.08.2022

Известно, что фитофлуин и ξ-каротин – С₄₀-каротиноиды с короткой цепью сопряженных двойных связей (СДС) (5 и 7 соответственно), являются универсальными предшественниками в биосинтезе окрашенных каротиноидов в растительных клетках. Ранее, используя стационарные измерения фотосенсибилизированной фосфоресценции синглетного кислорода (¹O₂), мы впервые показали, что фитофлуин эффективно генерирует ¹O₂ в аэрированных растворах и поэтому может служить источником фотодинамического стресса при УФ-возбуждении живых клеток (Ашихмин и соавт. (2020) Биохимия, **85**, 907-915). В настоящей работе, используя новые импульсные светодиоды, аэрированный гексафторбензол в качестве растворителя и разрешенные во времени измерения фосфоресценции ¹O₂, мы подтвердили высокую эффективность генерации ¹O₂ фитофлуином, квантовый выход которой по этим данным ≈ 0,4. Обнаружено, что ξ-каротин фотосенсибилизирует образование ¹O₂, хотя квантовый выход этого процесса почти в 30 раз ниже, чем у фитофлуина. Установлено, что оба каротиноида тушат ¹O₂ в темноте, измерены константы скорости тушения, равные соответственно $(3,6 \pm 0,9) \times 10^7$ и $(2,1 \pm 0,2) \times 10^8 \text{ M}^{-1}\cdot\text{c}^{-1}$, причем для ξ-каротина эта константа получена, вероятно, впервые. Данные показывают, что константы скорости тушения ¹O₂ обоими каротиноидами значительно (на 2 и 3 порядка соответственно) меньше, чем константа скорости ограниченных диффузий бимолекулярных процессов. Следовательно, протекторная способность каротиноидов – ингибирование ¹O₂ – относительно слабо выражена. Поэтому оба каротиноида можно рассматривать как потенциальные сенситизаторы фотодинамического стресса в клетках живых организмов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ξ-каротин, фитофлуин, синглетный кислород, фотосенсибилизация, фотодинамический стресс.

DOI: 10.31857/S0320972522100128, EDN: BDJBYO

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что фитоин, фитофлуин и ξ-каротин – С₄₀-каротиноиды с относительно короткими цепями сопряженных двойных связей (3–7 СДС) в клетках фотосинтезирующих организмов являются универсальными предшественниками в биосинтезе окрашенных каротинов и ксантофиллов, имеющих длинную цепь СДС [1]. Показано, что каротиноиды с числом СДС более 9 служат эффективными протекторами живых тканей, защищая их от фотоокислительного стресса ([1–7] и указанные там

ссылки). Полагают, что протекторные свойства этих каротиноидов основаны на их способности дезактивировать триплетные состояния хлорофиллов и бактериохлорофиллов, тушить синглетный кислород (¹O₂) и нейтрализовать свободные радикалы [1–7]. Напротив, изомеры зрительного пигмента – ретиналя (*транс*-формы, 11-*цис* и 13-*цис*) – полиена с короткой цепью СДС (6 СДС), эффективно фотосенсибилизируют образование ¹O₂ в неполярной среде в результате переноса энергии на кислород от триплетного состояния ретиналя [7–9]. Полагают, что именно этот процесс вызывает фотодинамическое повреждение сетчатки глаза [10]. Поэтому было высказано предположение, что полиены с короткой цепью СДС могут участвовать также в фотодинамическом повреждении фотосинтетических тканей [11]. В последнее

Принятые сокращения: ¹O₂ – синглетный кислород; СДС – сопряженная двойная связь; Φ_Δ – квантовый выход генерации ¹O₂.

* Адресат для корреспонденции.

время в серии работ лаборатории А.А. Москаленко (ИФБП РАН) получены экспериментальные данные, которые свидетельствуют о том, что каротиноиды LH2-комплексов пурпурных бактерий способны генерировать синглетный кислород и вызывать фотодеструкцию пигментов фотосинтетического аппарата, причем предполагается, что в фотосенсибилизации могут принимать участие как каротиноиды с короткой, так и с протяженной системой СДС [12–16]. До недавнего времени триплетные состояния каротиноидов и синглетный кислород не удавалось наблюдать при прямом фотовозбуждении каротиноидов, выделенных из фотосинтезирующих организмов. Триплетные состояния каротиноидов с протяженной системой СДС регистрировались лишь сенсибилизированно за счет переноса энергии от триплетных состояний хлорофиллов и бактериохлорофиллов и других фотосенсибилизаторов ([1–6] и указанные там ссылки).

В связи с изложенным недавно мы приступили к систематическому фотофизическому исследованию способностей каротиноидов с разной длиной системы СДС путем прямого измерения фотосенсибилизированной каротиноидами фосфоресценции 1O_2 , используя многолетний опыт работы в этой области группы А.А. Красновского (ФИЦ биотехнологии РАН) и новые фосфоресцентные спектрометры, собранные этой группой [17]. В первой работе этой серии мы обнаружили, что фитофлуин (5 СДС) эффективно генерирует 1O_2 в аэробных растворах, тогда как фитоин (3 СДС) почти не активен [18]. Главная задача настоящей работы состояла в экспериментальном изучении способности ζ -каротина генерировать и тушить синглетный кислород в аэрированных растворах и сравнении полученных данных с аналогичными параметрами растворов фитофлуина. Действительно, по оценкам, приведенным в работах Bensasson et al. [4] и Niedzwiedzki et al. [6], триплетный уровень ζ -каротина выше синглет-

ного $^1\Delta_g$ -уровня кислорода. Кроме того, известно, что листья мутантов кукурузы, биосинтез каротиноидов которых заканчивается на стадии образования ζ -каротина (ζ -каротиновые мутанты кукурузы), отличаются низкой фотостойкостью и высоким выходом триплетных состояний хлорофилла [19]. Таким образом, можно предположить, что у ζ -каротина антиоксидантные свойства выражены слабо.

Структурные формулы исследуемых каротиноидов показаны на рис. 1.

В отличие от ранее проведенных экспериментов [18], в настоящей работе использованы новые более мощные светодиоды и новая электронная система их модуляции. Это позволило сравнить разрешенные во времени кинетические и стационарные измерения фосфоресценции в растворах каротиноидов. Применение новой техники позволило подтвердить высокую фотосенсибилизирующую активность фитофлуина и уточнить квантовый выход этого процесса, а также впервые достоверно установить, что ζ -каротин генерирует 1O_2 при фотовозбуждении. Измерены также константы скорости тушения 1O_2 изученными каротиноидами, причем для ζ -каротина, насколько нам известно, эта константа получена впервые. В ближайшей перспективе мы планируем применить разработанные экспериментальные подходы к исследованию генерации синглетного кислорода каротиноидами с более длинной цепью СДС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фитофлуин и ζ -каротин (*транс*-формы) были выделены из клеток пурпурной серной фотосинтезирующей бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* ATCC 51935^T. Клетки выращивали при 28 ± 2 °C в анаэробных условиях на среде Пфеннига, приготовленной самостоятельно согласно составу, приведенному в работе Imhoff и Grüper [20], при освещении белым светом

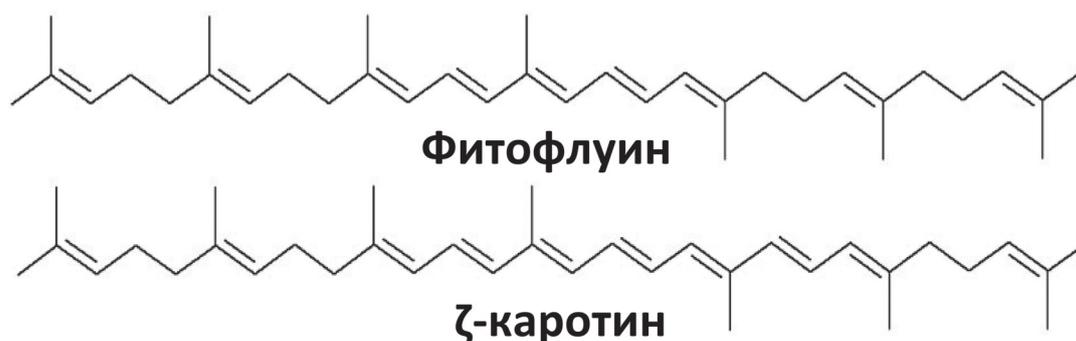


Рис. 1. Структурные формулы каротиноидов, исследованных в настоящей работе

лампы накаливания 90 Вт/м². Для накопления в клетках фитофлуина и ξ-каротина в среду для выращивания добавляли 53 мкМ дифениламина, который блокирует синтез каротиноидов с длинной цепью СДС [21]. Клетки разрушали методом ультразвукового дезинтегрирования, как описано в работе Ашихмина и соавт. [18].

Выделение каротиноидов проводили в два этапа. На первом этапе из мембран экстрагировали смесь фотосинтетических пигментов (каротиноиды и бактериохлорофилл), и затем получали общий экстракт каротиноидов по методике, описанной в работе Ashikhmin et al. [21]. На втором этапе отдельные каротиноиды выделяли методом ВЭЖХ на приборе Agilent 1200 («Agilent Technologies», США) с препаративной колонкой (10 × 250 мм) с обращенной фазой Waters Spherisorb ODS2 («Waters», США), используя градиент растворителей, описанный ранее [20]. Скорость подачи растворителей составляла 4 мл/мин. Разделение проводили при комнатной температуре. Всего было проведено четыре независимых выделения фитофлуина и ξ-каротина. Чистоту полученных каротиноидов дополнительно проверяли с помощью аналитической ВЭЖХ-системы Shimadzu («Shimadzu», Япония) при 22 °С, а также путем спектрофотометрии [21]. Примесь каротиноидов с большим количеством СДС в среднем составляла менее 0,1%.

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 (¹Δ_g) состояния молекул кислорода. Это явление, впервые обнаруженное в растворах фотосенсибилизаторов в работах Красновского [22, 23], в настоящее время широко применяется в аналитической практике [24–27]. Измерения проводили с использованием спектрометра, принципиальная схема которого описана в работе Красновского и соавт. [17]. Спектрометр позволял регистрировать фосфоресценцию при стационарном светодиодном возбуждении, а также проводить измерение ее спектральных параметров (спектров излучения и возбуждения) и кинетики затухания после возбуждающей вспышки. Для измерения спектров возбуждения лаборатория располагала набором из пяти светодиодов с максимумами излучения при 347, 367, 400, 421 и 460 нм, полученными от фирм «Полироник» и «Артледс» (Россия). При измерении параметров фосфоресценции мощность излучения светодиодов на поверхно-

сти кюветы не превышала 10 мВт/см². Полуширина полос излучения светодиодов составляла 12–26 нм. Для разрешенных во времени измерений использованы новые импульсные светодиоды с максимумом излучения 365 нм (полуширина – 18 нм) и 395 нм (полуширина – 11 нм) («Полироник»), снабженные разработанным специально для наших исследований модулирующим электронным чипом. 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 фотоэлектрической головкой S120VC («ThorLabs», США) и измерителем мощности Ophir ORION-TH с термической сенсорной головкой 20C-SH («Ophir Optronics», Израиль).

Фосфоресценцию ¹O₂ измеряли под углом 90° по отношению к возбуждающему лучу с помощью охлаждаемого фотоумножителя ФЭУ-112 («Экран оптические системы», Россия) со спектральной характеристикой С-1 через отсекающие фильтры, которые пропускают ИК-излучение на λ ≥ 1000 нм, и один из трех сменных интерференционных фильтров с максимумами пропускания при 1230, 1270 и 1310 нм и полуширине 10 нм. Стационарную интенсивность фосфоресценции измеряли цифровым милливольтметром («Эконикс-Эксперт», Россия).

Для кинетических измерений частоту повторения и длительность импульсов светодиодов регулировали с помощью внешних генераторов импульсов. Длительность импульса в большинстве измерений составляла 10 мкс, частоту повторения импульсов изменяли в диапазоне 5–100 Гц [13]. Сигнал фотоумножителя через широкополосный (400 мГц) предварительный усилитель поступал на электронную плату, работающую в режиме разрешенного во времени счета фотонов («Парсек», Россия). Счетная плата, которая запускалась от дополнительного импульса генератора, синхронизированного с импульсом светодиода, делила временной интервал между вспышками на 256, 512 или 1024 канала. Сигнал платы через USB-порт поступал на персональный компьютер, который осуществлял обработку сигнала. Кинетические кривые были получены путем накопления импульсов фотоумножителя в каждом канале в интервале 2–30 мин. Квантовый выход генерации ¹O₂ (Φ_Δ) измеряли, используя в качестве эталона органический фотосенсибилизатор феналенон (perinaphthenone, 1H_phenalen-1-one) («Merck», США), который имеет широкую полосу поглощения с максимумом при 350 нм и заметное поглощение при 400 нм. Известно,

что квантовый выход фотогенерации $^1\text{O}_2$ феналеноном близок к 1 ($0,95 \pm 0,05$) [27, 28]. Эксперименты проводили, используя в качестве растворителя гексафторбензол (C_6F_6), специально очищенный для наших экспериментов («Пим-Инвест», Россия). Выбор этого растворителя обусловлен тем, что из-за отсутствия атомов водорода в его молекуле время жизни синглетного кислорода в гексафторбензоле очень велико (16 мс) [13], что облегчает обнаружение и исследование свойств $^1\text{O}_2$. Кроме того, гексафторбензол химически достаточно инертен и не вступает в химическое взаимодействие с каротиноидами и синглетным кислородом [17, 18].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Фитофлуин. В предшествующей работе для кинетических измерений мы располагали импульсным светодиодом с длиной волны 405 нм [18], т.е. в области, в которой фитофлуин очень слабо поглощает свет, поэтому ранее основные измерения были выполнены при стационарном возбуждении. В настоящей работе использован новый импульсный светодиод 365 нм, максимум спектра излучения которого практически совпадает с максимумом спектра

поглощения фитофлуина (368 нм). Представляло интерес выяснить, насколько совпадают результаты стационарных и кинетических измерений.

Для экспериментов подбирали такую мощность светового потока ($\leq 1,5$ мВт), при которой выцветание фитофлуина за время записи экспериментальных кривых не превышало 4%. При этой мощности фотовозбуждения фосфоресценция $^1\text{O}_2$, фотосенсибилизированная аэрированным растворителем без фитофлуина, на нашем спектрометре не обнаруживалась. При облучении раствора фитофлуина и феналенона светодиодными импульсами возникала быстро затухающая фосфоресценция $^1\text{O}_2$ в области 1270 нм, кривые затухания которой хорошо описываются экспонентами (рис. 2):

$$I_p = (I_p)_0 \exp(-k_{\text{obs}}t), \quad (1)$$

где I_p – интенсивность фосфоресценции в фотонах в единицу времени, $(I_p)_0$ – начальная интенсивность фосфоресценции, соответствующая нулевому времени; k_{obs} – константа скорости затухания фосфоресценции; t – время.

По оси ординат на рис. 2 отложено отношение числа импульсов фотоумножителя, накопленных за время измерения в каждом канале счетчика фотонов (I_p), нормированное на ско-

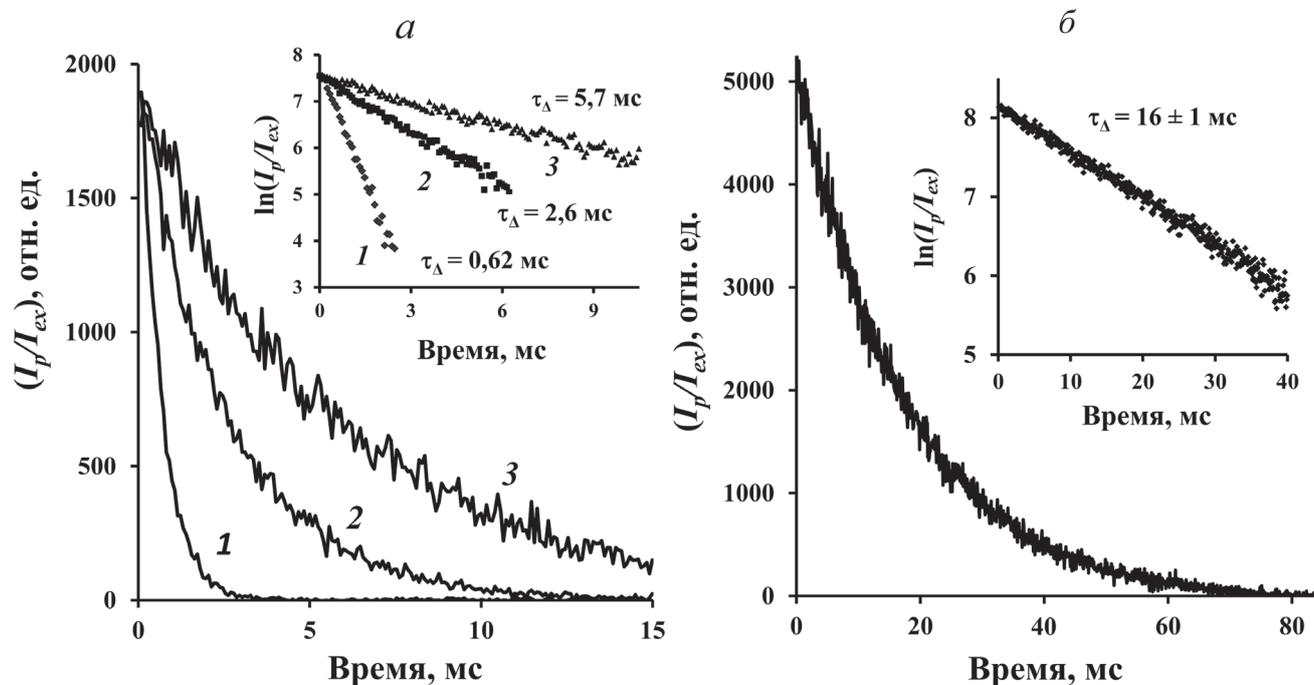


Рис. 2. Кривые затухания фосфоресценции синглетного кислорода в аэрированных растворах фитофлуина (а) и феналенона (б) в гексафторбензоле после облучения 10-микросекундными вспышками светодиода 365 нм с частотой повторения 20 Гц (а) и 10 Гц (б); (I_p/I_{ex}) – отношение интенсивности фосфоресценции (I_p) к скорости поглощения фотонов (I_{ex}) пигментами. На вставках показаны те же кривые затухания в полулогарифмическом масштабе. Средняя мощность светового потока светодиода составляла примерно 1,5 мВт. Время накопления сигнала 2 мин, ширина канала – 81,92 мкс. Концентрация растворов фитофлуина – 34 (1), 7,4 (2) и 2,5 (3) мкМ; концентрация феналенона – 17 мкМ

рость поглощения фотонов (I_{ex}) фотосенсибилизаторами:

$$I_{ex} = I_{LED}(1-T) = I_{LED}(1-10^{-A}), \quad (2)$$

где I_{LED} – скорость генерации фотонов светодиодом, T – коэффициент пропускания света раствором; A – оптическая плотность фотосенсибилизаторов в области излучения светодиода (365 нм). Очевидно, что отношение $(I_p)_0/I_{ex}$ прямо пропорционально квантовому выходу генерации синглетного кислорода при фотовозбуждении фотосенсибилизатора. Из рис. 2 видно, что величина $(I_p)_0/I_{ex}$ оставалась неизменной при более чем десятикратном уменьшении концентрации фитофлуина, тогда как время жизни фосфоресценции (τ_d) резко уменьшалось, а обратная величина – константа скорости затухания (k_{obs}) – резко увеличивалась с увеличением концентрации фитофлуина (рис. 2, а). Эти данные показывают, что квантовый выход генерации 1O_2 фитофлуином не зависит от его концентрации, тогда как увеличение концентрации фитофлуина приводит к тушению синглетного кислорода каротиноидом.

На рис. 2, б показана кинетика затухания фосфоресценции синглетного кислорода в аэрированном растворе фенолалена при отсутствии каротиноидов. Фенолален в исполь-

зованной концентрации слабо тушит синглетный кислород, поэтому время затухания фосфоресценции практически соответствует времени жизни 1O_2 в аэрированном гексафторбензоле (~16 мс) [17].

На рис. 3, а представлен спектр фосфоресценции в аэрированном растворе фитофлуина при стационарном возбуждении светодиодом 367 нм. Спектр имеет максимум при ~1270 нм, соответствующий максимуму спектра фосфоресценции 1O_2 . Точно такой же спектр получается при измерении начальной интенсивности фосфоресценции при импульсном возбуждении (не показано). На рис. 3, б показан результат оценки спектра возбуждения фосфоресценции в растворе фитофлуина с помощью набора стационарных светодиодов с разной длиной волны излучения. Спектры поглощения и возбуждения нормированы в точке 367 нм. Как видно из рис. 3, квантовая эффективность возбуждения фосфоресценции (I_p/I_{LED}) максимальна для светодиодов, длина волны излучения которых соответствует основным максимумам поглощения фитофлуина. В области 400 нм, где фитофлуин не поглощает свет, квантовая эффективность фосфоресценции близка к нулю. Полученные данные не оставляют сомнения в том, что фосфоресценция принадлежит 1O_2 , который генерируется в результате фотовозбуждения фитофлуина.

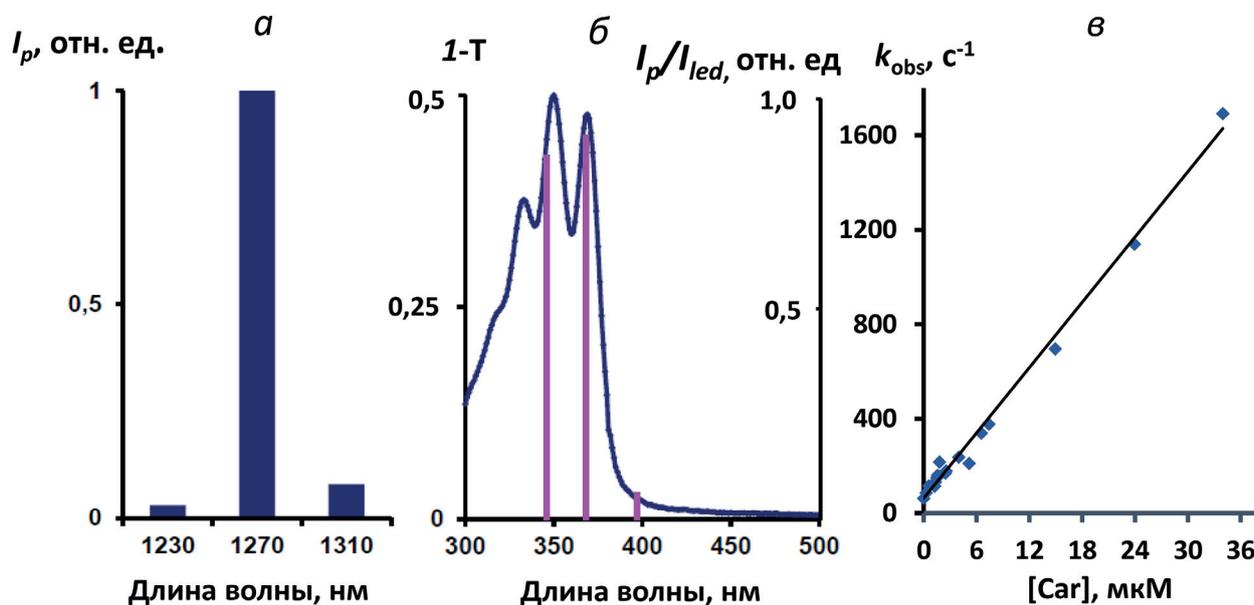


Рис. 3. Спектральные и кинетические параметры фосфоресценции синглетного кислорода в аэрированных растворах фитофлуина в гексафторбензоле. а – Спектр фосфоресценции, измеренный при стационарном возбуждении (367 нм) раствора фитофлуина (7,4 мкМ) с помощью набора из трех интерференционных светофильтров (I_p – интенсивность фосфоресценции при стационарном возбуждении). б – Спектр поглощения раствора фитофлуина 4 мкМ (T – коэффициент пропускания света раствором), и спектр возбуждения фосфоресценции того же раствора (вертикальные линии), измеренный с помощью трех стационарных светодиодов с длиной волны 347, 367 и 400 нм, I_{LED} – скорость излучения фотонов (фотоны в секунду) светодиодом; в – зависимость константы скорости затухания фосфоресценции 1O_2 (k_{obs}) после возбуждающей вспышки от концентрации фитофлуина в аэрированном гексафторбензоле

Из рис. 3, в видно, что зависимость константы скорости затухания фосфоресценции (k_{obs}) от концентрации фитофлуина определяется уравнением Штерна–Фольмера:

$$k_{\text{obs}} = (k_{\text{obs}})_0 + k_q \times [\text{Car}], \quad (3)$$

где $(k_{\text{obs}})_0$ – константа скорости затухания фосфоресценции в аэрированном гексафторбензоле ($\sim 60 \text{ с}^{-1}$ [17]). Следует отметить, что для этих измерений мы использовали четыре независимо выделенных препарата фитофлуина. Рис. 3, в показывает линейную функцию, полученную путем усреднения всех полученных данных, хотя при работе с каждым отдельным препаратом мы наблюдали несколько иной угол наклона прямой. В итоге, по этим данным, наиболее вероятная величина константы скорости тушения составляет $(3,6 \pm 0,9) \times 10^7 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, т.е. в пределах погрешности измерений соответствует тому значению, которое было получено нами ранее путем тушения фитофлуином фосфоресценции $^1\text{O}_2$, фотосенсибилизированной феналеноном [18].

Данные рис. 2 были использованы для расчета квантового выхода генерации синглетного кислорода (Φ_{Δ}) фитофлуином. Относительные значения Φ_{Δ} в растворах фитофлуина и феналенона, $(\Phi_{\Delta})_{\text{phyt}}/(\Phi_{\Delta})_{\text{phen}}$, очевидно, соответствуют относительным значениям параметра $(I_p)_0/I_{\text{ex}}$ в растворах этих фотосенсибилизаторов:

$$(\Phi_{\Delta})_{\text{phyt}}/(\Phi_{\Delta})_{\text{phen}} = [(I_p)_0/I_{\text{ex}}]_{\text{phyt}}/[(I_p)_0/I_{\text{ex}}]_{\text{phen}}. \quad (4)$$

Значения $(I_p)_0$ рассчитывали путем экстраполяции экспоненциальных кривых затухания фосфоресценции к нулевому моменту времени. Как указывалось, в растворах фитофлуина значения $(I_p)_0/I_{\text{ex}}$ не зависели от концентрации каротиноида, т.е. квантовые выходы генерации синглетного кислорода одинаковы при всех использованных концентрациях фитофлуина. Для количественных измерений, учитывая широкую полосу излучения светодиода (18 нм), величину I_{ex} для каротиноида и стандарта определяли как:

$$I_{\text{ex}} = I_{\text{LED}} [\int (I_{\text{LED}})_0 (1-10^{-A}) dv] / \int (I_{\text{LED}})_0 dv, \quad (5)$$

где I_{LED} – суммарная интенсивность излучения светодиода в фотонах в секунду, $(I_{\text{LED}})_0$ – контур спектральной полосы излучения светодиода, величина $(I_{\text{LED}})_0$ изменяется от 0 до 1, ν – частота, соответствующая длине волны излучения светодиода.

По данным кинетических измерений мы получили, что:

$$(\Phi_{\Delta})_{\text{phyt}}/(\Phi_{\Delta})_{\text{phen}} = [(I_p)_0/I_{\text{ex}}]_{\text{phyt}}/[(I_p)_0/I_{\text{ex}}]_{\text{phen}} = 0,41 \pm 0,06. \quad (6)$$

Отсюда следует, что квантовый выход генерации $^1\text{O}_2$ фитофлуином соответствует

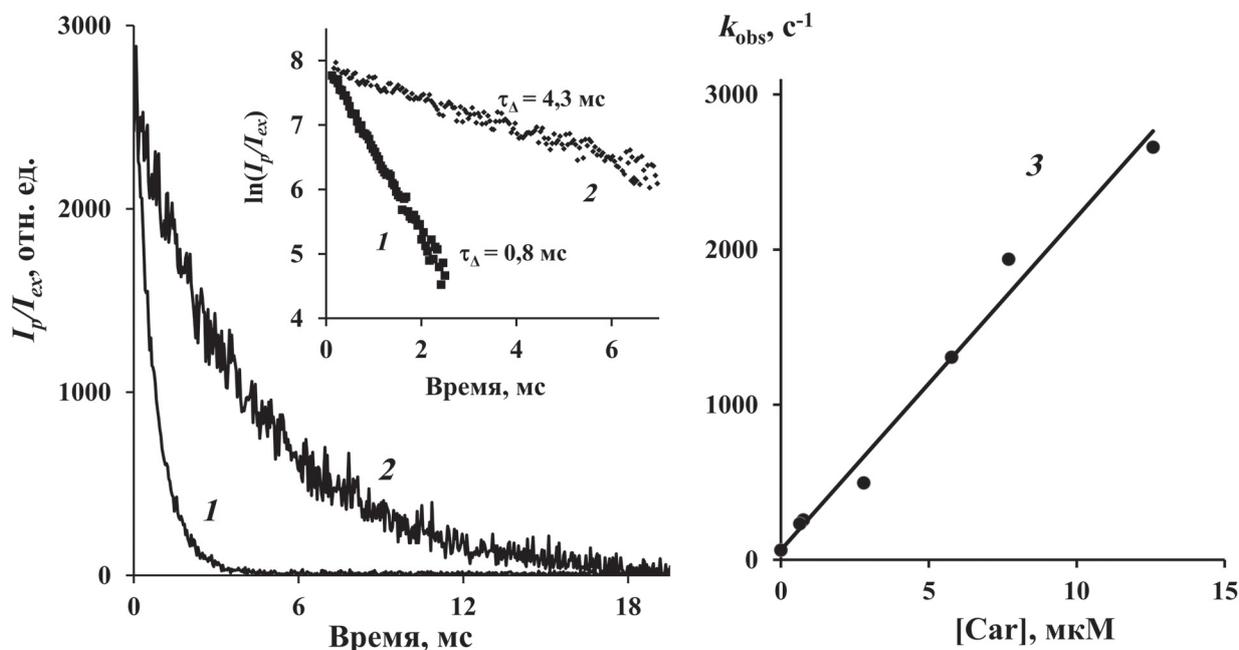


Рис. 4. Кривые затухания (1 и 2) и тушение фосфоресценции синглетного кислорода (1270 нм) в растворах ζ -каротина (1 – 5,9 мкМ; 2 – 0,64 мкМ) в гексафторбензоле после облучения 10-микросекундными вспышками светодиода (395 нм) с частотой повторения 50 Гц. На вставке показаны кривые затухания в полулогарифмическом масштабе. Средняя мощность возбуждающего излучения светодиода – 5 мВт. Время накопления сигнала – 5 мин. 3 – Зависимость констант скоростей затухания фосфоресценции от концентрации ζ -каротина

$0,41 * 0,95 = 0,39 \pm 0,06$. Этот результат подтверждает описанный нами ранее факт, что фитофлуин эффективно генерирует синглетный кислород при фотовозбуждении [18]. Однако полученное в настоящей работе значение квантового выхода примерно вдвое меньше, чем опубликованное нами ранее [18]. Мы полагаем, что ранее точность измерений была ниже из-за того, что измерения выполняли, используя стационарную интенсивность фосфоресценции I_p , которая определяется не только квантовым выходом генерации синглетного кислорода фотосенсибилизаторами, но также и временем жизни фосфоресценции, которое при стационарных измерениях не контролируется.

ξ-каротин. Приемы, разработанные в экспериментах с растворами фитофлуина, были затем применены к растворам ξ-каротина. Для фотовозбуждения ξ-каротина использовали новый импульсный светодиод с длиной волны 395 нм. Для измерений подбирали такую мощность светового потока (≤ 5 мВт), при которой выцветание ξ-каротина за время регистрации экспериментальных кривых не превышало 2%. При облучении импульсами этого светодиода мы наблюдали фотосенсибилизированную фосфоресценцию 1O_2 при 1270 нм, кинетика затухания которой при двух сильно различающихся концентрациях

ξ-каротина показана на рис. 4 (кривые 1 и 2). Для наблюдения этих кинетических кривых потребовалось более длительное время накопления сигнала и более высокая средняя мощность светового облучения, чем при исследовании фитофлуина. Это показывает, что квантовый выход фосфоресценции в растворах ξ-каротина существенно ниже. Тем не менее начальная интенсивность этой фосфоресценции (I_p)₀ в исследованных растворах ξ-каротина превышала интенсивность фосфоресценции 1O_2 в чистом растворителе при отсутствии ξ-каротина более чем на два порядка величины (не показано).

Как видно из рис. 4 (кривые 1 и 2), скорость затухания фосфоресценции возрастает с увеличением концентрации каротина. Отсюда следует, что ξ-каротин эффективно тушит синглетный кислород. Тушение подчиняется уравнению Штерна–Фольмера (рис. 4, кривая 3). Константа скорости тушения, рассчитанная по этим данным для четырех независимых выделений ξ-каротина, составила $(2,1 \pm 0,2) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$. Таким образом, ξ-каротин тушит 1O_2 на порядок сильнее, чем фитофлуин. Однако в обоих случаях константы скорости тушения в 100–1000 раз меньше констант скорости тушения 1O_2 , например β-каротином $\sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ [15].

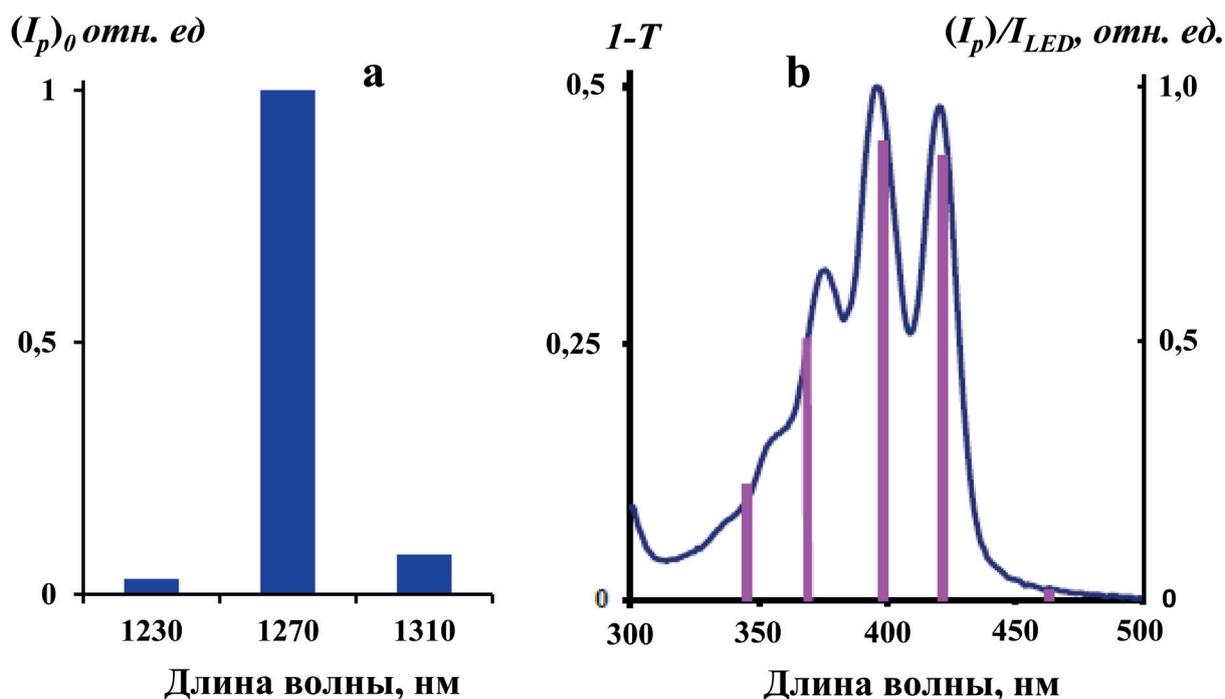


Рис. 5. Спектр фосфоресценции синглетного кислорода в растворе ξ-каротина (5,9 мкМ) в гексафторбензоле (а) при импульсном возбуждении светодиодом (395 нм), измеренный с помощью интерференционных светофильтров. Спектр поглощения ξ-каротина (сплошная линия), измеренный в единицах $I-T$ (б), где T – светопропускание раствора; вертикальные линии – спектр возбуждения фосфоресценции в единицах I_p/I_{LED} , измеренный при стационарном возбуждении набором из нескольких светодиодов с длиной волны излучения 347, 367, 400, 421 и 460 нм

Из рис. 5, а следует, что спектр фосфоресценции в аэрированном растворе ζ -каротина имеет максимум при ~ 1270 нм, т.е. соответствует максимуму фосфоресценции $^1\text{O}_2$. Рис. 5, б показывает, что спектр возбуждения этой фосфоресценции (зависимость квантовой эффективности фосфоресценции от длины волны возбуждения) соответствует спектру поглощения ζ -каротина. Таким образом, данные убедительно показывают, что ζ -каротин генерирует синглетный кислород при фотовозбуждении в аэрированном растворе.

Квантовый выход генерации синглетного кислорода (Φ_{Δ}) ζ -каротином измеряли методом сравнения относительных значений $(I_p)_0/I_{ex}$ в растворах ζ -каротина и феналенона по методике, аналогичной описанной выше для фитофлуина. Установлено, что в растворах ζ -каротина значения $(I_p)_0/I_{ex}$ не зависели от концентрации каротиноида, т.е. квантовые выходы генерации синглетного кислорода одинаковы при всех использованных концентрациях ζ -каротина. По данным кинетических измерений мы получили, что:

$$\frac{(\Phi_{\Delta})_{\text{car}}}{(\Phi_{\Delta})_{\text{phen}}} = \frac{[(I_p)_0/I_{ex}]_{\text{car}}}{[(I_p)_0/I_{ex}]_{\text{phen}}} = 0,015 \pm 0,003. \quad (7)$$

Отсюда следует, что квантовый выход генерации $^1\text{O}_2$ ζ -каротином соответствует $0,015 * 0,95 = 0,014 \pm 0,003$. Эта величина примерно в 30 раз меньше, чем у фитофлуина.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, с помощью новых импульсных светодиодов и разрешенных во времени измерений фосфоресценции $^1\text{O}_2$, показано, что фитофлуин и ζ -каротин, которые являются универсальными предшественниками в биосинтезе окрашенных C_{40} -каротиноидов у растений и бактерий, фотосенсибилизируют образование $^1\text{O}_2$ при фотовозбуждении, а невозбужденные молекулы этих каротиноидов тушат $^1\text{O}_2$. Результаты измерения квантовых выходов генерации и константы скорости тушения синглетного кислорода каротиноидами суммированы в таблице. Для ζ -каротина эти данные получены впервые.

Из таблицы видно, что каротиноиды сильно различаются по своей способности фотосенсибилизировать и тушить $^1\text{O}_2$. Фитофлуин – эффективный фотосенсибилизатор генерации $^1\text{O}_2$. ζ -Каротин примерно в 30 раз менее эффективен как фотосенсибилизатор, но на порядок более эффективен как тушитель.

Тем не менее константы скорости тушения $^1\text{O}_2$ каротиноидами в 100–1000 раз меньше, чем константа скорости ограниченных только диффузией бимолекулярных реакций ($\sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$). Полученная нами константа скорости тушения синглетного кислорода фитофлуином в пределах экспериментальных погрешностей соответствует значению, которое было получено в нашей предшествующей работе [18] и согласуется с величиной верхнего предела этой константы, приведенной в работе Mathews-Roth et al. [2]. Для ζ -каротина эта константа, по-видимому, измерена в настоящей работе впервые. Из значений констант следует, что изученные каротиноиды не могут служить эффективными ингибиторами синглетного кислорода в живых системах. Это заключение находится в согласии с низкой фотоустойчивостью ζ -каротиновых мутантов кукурузы [19]. В связи с этим наиболее вероятно, что ζ -каротин и фитофлуин можно рассматривать как потенциальные фотосенсибилизаторы фотодинамического стресса в живых клетках, а не как протекторы их структур.

Предположительный механизм генерации синглетного кислорода каротиноидами показан на рис. 6. Известно, что главные полосы поглощения каротиноидов соответствуют переходу из основного на второй короткоживущий синглетный уровень их молекул, а переход из основного на первый синглетный уровень запрещен и имеет малую интенсивность [29]. Из полученных нами спектров действия фосфоресценции синглетного кислорода следует, что фотовозбуждение каротиноидов определяется заселением именно S_2 -состояния. Дальнейшие этапы предположительны. В результате спонтанной релаксации молекул происходит заселение состояния S_1 , а затем интерконверсия в T_1 -состояние. Перенос энергии с T_1 на молекулярный кислород приводит к образованию $^1\text{O}_2$ и излучению фосфоресценции. Не исключено, что тушение $^1\text{O}_2$ изученными каротиноидами является результатом обратного термоактивированного переноса энергии от синглетного кислорода на триплетный уровень каротиноида. Однако это требует отдельного обоснования и выходит за рамки предмета настоящей статьи.

Квантовые выходы генерации $^1\text{O}_2$ и константы скорости тушения $^1\text{O}_2$ каротиноидами в аэрированном гексафторбензоле

Каротиноид	СДС	Φ_{Δ}	$k_q, \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$
Фитофлуин	5	$0,39 \pm 0,06$	$(3,6 \pm 0,9) \times 10^7$
ζ -каротин	7	$0,014 \pm 0,003$	$(2,1 \pm 0,2) \times 10^8$

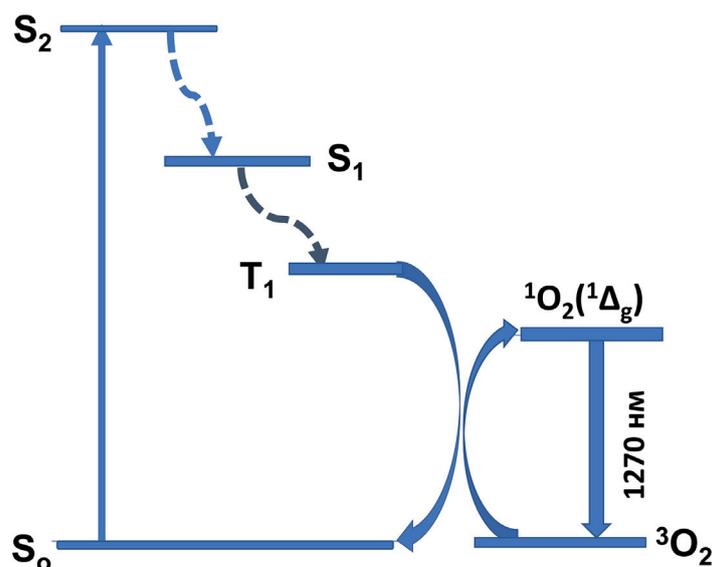


Рис. 6. Предположительная энергетическая диаграмма переходов в молекулах каротиноидов, приводящая к фотосенсibilизации образования 1O_2

Предложенная схема согласуется с литературными данными [4, 6], свидетельствующими о том, что энергия триплетных состояний исследованных каротиноидов (E_T) выше энергии $^1\Delta_g$ – состояния кислорода (0,96 эв). Согласно Bensasson et al. [4], значения E_T равны 1,45 и 1,12 эв соответственно для фитофлуина и ξ-каротина. Однако эти данные нельзя считать полностью достоверными, так как они рассчитаны путем экстраполяции эмпирической линейной зависимости между E_T^{-1} и числом СДС, полученной для синтетических полиенов с короткой СДС [4]. Прямые измерения фосфоресценции этих каротиноидов, которые позволили бы установить точную энергию их триплетных состояний, пока не выполнены.

Известно, что время жизни триплетного состояния ξ-каротина составляет 23 мкс [4]. Эта величина, полученная методом импульсного радиолиза, коррелирует с механизмом, приведенным на рис. 6. Нам не удалось найти в литературе константу скорости взаимодействия триплетного состояния ξ-каротина с кислородом. Однако она измерена в растворах синтетических аналогов – полиенов. Получено, что для всех каротиноидов эта константа равна $(2-4) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [30]. Кинетический анализ показывает, что при такой константе и обычной для аэрированных растворов концентрации кислорода (2–4 мМ) [31] все триплетные молекулы пигментов дезактивируются путем переноса энергии на растворенный кислород [23]. Таким образом, измеренные нами значения Φ_Δ примерно равны значениям квантового выхода триплетных состояний молекул каротиноидов.

В литературе, к сожалению, не описаны точные данные о квантовом выходе образования триплетных состояний у изученных в настоящей работе каротиноидов. Нам удалось найти только одну работу [4], в которой была сделана попытка количественно измерить этот параметр методом наносекундного импульсного фотолиза. Полученный для ξ-каротина квантовый выход практически равен нулю (меньше минимального, доступного для измерений авторами [4]). Отсюда следует, что, по нашим данным, квантовые выходы заселения триплетного состояния изученными каротиноидами существенно выше, чем следует из сделанных ранее методом флеш-фотолиза измерений [4].

Представляет интерес, что полученные нами квантовые выходы образования триплетного состояния каротиноидов и синглетного кислорода коррелируют с информацией о квантовом выходе флуоресценции каротиноидов. Известно, что фитофлуин излучает относительно сильную флуоресценцию из состояния S_1 (500 нм) с квантовым выходом $0,05 \pm 0,01$ при комнатной температуре [32, 33]. Литературных данных о квантовом выходе флуоресценции ξ-каротина нам найти не удалось. Однако известен квантовый выход флуоресценции из состояния S_1 у аналога – синтетического полиена с 7 СДС [34]. Он примерно на порядок ниже, чем у синтетического аналога с 5 СДС. Следовательно, можно предположить, что выход синглетного кислорода, долгоживущего триплетного состояния (T_1) и длинноволновой S_1 -флуоресценции каротиноидов, определяется вероятностью внутримолекулярного заселения S_1 -состояния при спонтанной дезактивации состояния S_2 .

Вклад авторов. А.А. Красновский мл., А.А. Ашихмин, А.А. Москаленко – концепция и руководство работой; А.А. Ашихмин – выделение каротиноидов; А.А. Красновский и А.С. Бендикис – конструирование приборов и проведение экспериментов; А.А. Ашихмин, А.С. Бендикис, А.А. Москаленко, А.А. Красновский мл. – обсуждение результатов исследования; А.А. Красновский мл., А.А. Ашихмин и А.С. Бендикис – написание текста и его редактирование.

Финансирование. Работа выполнена при частичной поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (МК-1352.2021.1.4), Российского

фонда фундаментальных исследований (грант № 19-04-00331-а) и государственных заданий ФИЦ Биотехнологии РАН (12241100080-3) и ФИЦ ПНЦБИ РАН (122041100204-3).

Благодарности. Авторы благодарят ООО «Полироник» (Москва) за техническую помощь и ООО «ПиМ-Инвест» (Москва) за предоставление и очистку растворителей, а также Журавлеву З.А. (ИФПБ РАН) за помощь в выращивании культуры *Ectothiorhodospira haloalkaliphila*.

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

1. Britton, G. (2008) Functions of Intact Carotenoids, in *Carotenoids. Natural Functions* (Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfanger, H., eds) Birkhauser Verlag, Switzerland, Vol. 4, pp. 189-212, doi: 10.1007/978-3-7643-7499-0_10.
2. Mathews-Roth, M., Wilson, T., Fujimori, E., and Krinsky, N. (1974) Carotenoid chromophore length and protection against photosensitization, *Photochem. Photobiol.*, **19**, 217-222, doi: 10.1111/j.1751-1097.1974.tb06501.x.
3. Krinsky, N. (1974) Carotenoid protection against oxidation, *Pure Appl. Chem.*, **51**, 649-660, doi: 10.1351/pac197951030649.
4. Bensasson, R., Land, E. J., Maudinas, B. (1976) Triplet states of carotenoids from photosynthetic bacteria studied by nanosecond ultraviolet pulse irradiation, *Photochem. Photobiol.*, **23**, 189-193, doi: 10.1111/j.1751-1097.1976.tb07240.x.
5. Cogdell, R. J., Howard, T. D., Bittl, R., Schlodder, E., Geisenheimer, I., et al. (2000) How carotenoids protect bacterial photosynthesis, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, **355**, 1345-1349, doi: 10.1098/rstb.2000.0696.
6. Niedzwiedzki, D. M., Swainsbury, D. J. K., Canniffed, D. P., Hunter, C. N., and Hitchcock, A. (2020) A photosynthetic antenna complex foregoes unity carotenoid-to-bacteriochlorophyll energy transfer efficiency to ensure photoprotection, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **117**, 6502-6508, doi: 10.1073/pnas.1920923117.
7. Edge, R., and Truscott, T. G. (2018) Singlet oxygen and free radical reactions of retinoids and carotenoids – a review, *Antioxidants*, **7**, 5-16, doi: 10.3390/antiox7010005.
8. Красновский А. А. (мл), Каган В. Е. (1978) Генерация и тушение синглетного кислорода ретиналями, *Доклады АН СССР*, **242**, 229-232.
9. 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, doi: 10.1016/0014-5793(79)81198-9.
10. Островский М. А., Федорович И. Б. (1994) Ретиналь как сенсibilизатор фотоповреждения ретинальсодержащих белков сетчатки глаза, *Биофизика*, **39**, 13-25.
11. Красновский А. А. (мл) (1986) Синглетный кислород в фотосинтезирующих организмах, *Журнал Всесоюзного химического общества им. Д.И. Менделеева (Российский химический журнал)*, издательство Химия, Москва, **31**, 562-567.
12. Махнева З. К., Ерохин Ю. Е., Москаленко А. А. (2007) Фотосенсибилизированное каротиноидами окисление димеров бактериохлорофилла светособирающих комплексов В800-850 в клетках *Allochro-matium minutissimum*, *Доклады Академии наук*, **416**, 408-411.
13. Махнева З. К., Большаков М. А., Ашихмин А. А., Ерохин Ю. Е., Москаленко А. А. (2009) Влияние синего света на стабильность структуры антенных комплексов из *Allochro-matium minutissimum* с разным содержанием каротиноидов, *Биологические мембраны*, **26**, 188-193.
14. Махнева З. К., Ашихмин А. А., Большаков М. А., Москаленко А. А. (2020) Выделение синглетного кислорода мембранами пурпурных фотосинтезирующих бактерий при облучении светом происходит при возможном участии каротиноидов, *Микробиология*, **89**, 169-179, doi: 10.31857/S0026365620010097.
15. Махнева З. К., Ашихмин А. А., Большаков М. А., Москаленко А. А. (2019) Взаимодействие бактериохлорофилла с синглетным кислородом в мембранах пурпурных фотосинтезирующих бактерий:

- существует ли защитная функция каротиноидов? Доклады Академии наук, **486**, 504-508, doi: 10.31857/S0869-56524864504-508.
16. Makhneva, Z. K., Bolshakov, M. A., and Moskalenko, A. A. (2021) Carotenoids do not protect bacteriochlorophylls in isolated light-harvesting LH2 complexes of photosynthetic bacteria from destructive interactions with singlet oxygen, *Molecules*, **26**, 5120, doi: 10.3390/molecules26175120.
 17. Красновский А. А., Бендикис А. С., Козлов А. С. (2019) Кинетические измерения фосфоресценции синглетного кислорода методом разрешенного во времени счета фотонов в растворителях, не содержащих водородных атомов, *Биохимия*, **84**, 240-251, doi: 10.1134/S0320972519020076.
 18. Ашихмин А. А., Бендикис А. С., Москаленко А. А., Красновский А. А. мл. (2020) Фитофлуин – эффективный фотосенсибилизатор образования синглетного кислорода под действием УФ-А излучения, *Биохимия*, **85**, 907-915, doi: 10.31857/S0320972520070052.
 19. Красновский А. А. мл., Ковалев Ю. В., Фалуди-Даниэль А. (1980) Фосфоресценция и замедленная флуоресценция хлорофилла в мутантах кукурузы с аномальным составом каротиноидов, Доклады Академии наук СССР, **251**, 1264-1267.
 20. Imhoff, J. F., and Trüper, H. G. (1977) *Ectothiorhodospira halochloris* sp. nov., a new extremely halophilic phototrophic bacterium containing bacteriochlorophyll *b*, *Arch. Microbiol.*, **114**, 115-121, doi: 10.1007/BF0041077220.
 21. Ashikhmin, A., Makhneva, Z., and Moskalenko, A. (2014) The LH2 complexes are assembled in the cells of purple sulfur bacterium *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* with inhibition of carotenoid biosynthesis, *Photosynth. Res.*, **119**, 291-303, doi: 10.1007/s11120-013-9947-6.
 22. Красновский А. А., мл. (1976) Фотосенсибилизированная люминесценция синглетного кислорода в растворе, *Биофизика*, **21**, 748-749.
 23. Krasnovsky A. A., Jr. (1979) Photoluminescence of singlet oxygen in pigment solutions, *Photochem. Photobiol.*, **29**, 29-36, doi: 10.1111/j.1751-1097.1979.tb09255.x.
 24. Krasnovsky A. A., Jr. (1998) Phosphorescence studies of singlet oxygen in photobiochemical systems, *Membr. Cell Biol.*, **12**, 665-690.
 25. Krasnovsky A. A. Jr. (2008) Luminescence and photochemical studies of singlet oxygen photonics, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, **196**, 210-218, doi: 10.1016/j.jphotochem.2007.12.015.
 26. Schweitzer, C., and Schmidt, R. (2003) Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen, *Chem. Rev.*, **103**, 1685-1757, doi: 10.1021/cr010371d.
 27. 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, doi: 10.1002/hlca.19910740110.
 28. Schmidt, R., Tanelian, C., Dunsbach, R., and Wolf, C. (1994) Phenalene, a universal compound for the determination of quantum yields of singlet oxygen O₂ (¹Δ_g) sensitization, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, **79**, 11-17, doi: 10.1016/1010-6030(93)03746-4.
 29. Frank, H. A., and Christensen, R. L. (2008) Excited electronic states, photochemistry and photophysics of carotenoids, in *Carotenoids*, vol. 4, Chapt. 9, Birkhaeuser Verlag, Basel, pp. 167-188.
 30. Mathis, P., and Schenck, C. C. (1982) Functions of carotenoids in photosynthesis, in *Carotenoids chemistry and Biochemistry* (Britton, G., and Goodwin, T. W., eds) Pergamon Press, Oxford, New York, p. 339-351.
 31. Murov, S. L., Chermichael, I., and Hug, G. L. (1993) *Handbook of Photochemistry*, Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong, p. 290.
 32. 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.
 33. Andersson, P. O., Takaichi, S., Cogdell, R. J., and Gillbro, T. (2001) Photophysical characterization of natural *cis*- carotenoids, *Photochem. Photobiol.*, **74**, 549-557, doi: 10.1562/0031-8655(2001)074<0549:pconcc>2.0.co;2.
 34. Andersson, P. O., Bachilo, S. M., Chen, R.-L., and Gillbro, T. (1995) Solvent and temperature effects on dual fluorescence in a series of carotenes. Energy gap dependence of the internal conversion rate, *J. Phys. Chem.*, **99**, 16199-16209, doi: 10.1021/j100044a002.

ξ-CAROTENE: GENERATION AND QUENCHING OF SINGLET OXYGEN, COMPARISON WITH PHYTOFLUENE

A. A. Ashikhmin¹, A. S. Benditkis², A. A. Moskalenko¹, and A. A. Krasnovsky, Jr.^{2*}

¹ Institute of Basic Biological Problems, Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences”, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

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

It is known that phytofluene and ζ -carotene, C_{40} carotenoids with a short chain of conjugated double bonds (CDB) (5 and 7, respectively), are universal precursors in the biosynthesis of colored carotenoids in plant cells. Previously, using mainly stationary measurements of photosensitized phosphorescence of singlet oxygen (1O_2), we discovered that phytofluene efficiently generates 1O_2 in aerated solution and therefore, can serve as a source of the UV photodynamic stress in living cells [Ashikhmin et al. (2020) *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 773-780]. In the present paper, by using novel pulsed light emitting diodes (LEDs), aerated hexafluorobenzene as a solvent and time-resolved measurements of 1O_2 phosphorescence we confirmed that phytofluene efficiently photosensitizes 1O_2 formation. The quantum yield of this process according to the novel experiments is about 0.4. An ability to generate 1O_2 was also found in aerated solutions of ζ -carotene although the quantum yield of this process is 30-fold lower than in phytofluene solutions. Both carotenoids were found to quench 1O_2 in the dark with the quenching rate constants equal to $(3,6 \pm 0,9) \times 10^7$ and $(2,1 \pm 0,2) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ respectively. To our knowledge, the rate constant of 1O_2 quenching by ζ -carotene has been reported in the present paper for the first time. It follows from the data obtained that the rate constants of 1O_2 quenching by both carotenoids are much (by 2-3 orders of magnitude) smaller than the rate constant of the diffusion-limited biomolecular reactions. Hence, both carotenoids are weak protectors against 1O_2 oxidative activity. It is more likely that they are potential promoters of photodynamic stress in living cells.

Keywords: ζ -carotene, phytofluene, singlet oxygen, photosensitivity, photodynamic stress