

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

ЗАЩИТА БХЛ850 ОТ ДЕЙСТВИЯ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА
В МЕМБРАНАХ СЕРНОЙ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ БАКТЕРИИ
ALLOCHROMATIUM VINOSUM С ПОМОЩЬЮ ТУШИТЕЛЕЙ

© 2019 г. З. К. Махнева^а, А. А. Ашихмин^а, М. А. Большаков^а, А. А. Москаленко^а, *

^аИнститут фундаментальных проблем биологии РАН, Московская обл., Пушкино, 142290, Россия

*e-mail: lfbv22@gmail.com

Поступила в редакцию 30.07.2018 г.

После доработки 20.09.2018 г.

Принята к публикации 02.10.2018 г.

Исследовано действие синглетного кислорода в системе: мембраны *Allochrochromatium (Alc.) vinosum* штамм МГУ–бенгальский розовый–свет (547–600 нм) без тушителя или с тушителем. Показано, что в системе без тушителя наблюдается выцветание полосы БХл850 светособирающего комплекса LH2, и появляется пик поглощения в области 698 нм, принадлежащий 3-ацетил-хлорофиллу, продукту окисления БХл. Изучена эффективность пяти тушителей синглетного кислорода – аскорбата натрия, гистидина, имидазола, тролокса и азида натрия – на нейтрализацию действия синглетного кислорода на бактериохлорофилл (БХл) в светособирающих комплексах мембран *Alc. vinosum* МГУ. Показано, что все они, за исключением азида натрия, успешно нейтрализовали его действие.

Ключевые слова: фотосинтезирующие бактерии, фотосинтез, комплексы LH2 и LH1, синглетный кислород, 3-ацетил-хлорофилл, тушители синглетного кислорода

DOI: 10.1134/S0026365619010129

Пурпурные фотосинтезирующие бактерии делятся на две группы по возможности их роста в присутствии кислорода: аэробные и анаэробные. К первой из них относятся несерные бактерии, например, *Rb. sphaeroides*, которая может расти как фототрофно, и тогда в ее клетках (комплексах) накапливается сфероиден, или фотогетеротрофно, в этом случае сфероиден заменяется сфероиденоном, имеющим одну дополнительную кетогруппу (Takai-chi, 2009). Во вторую группу входят серные бактерии (*Alc. vinosum*, *T. tepidum* и т.д.), которые могут расти только фототрофно. Очевидно, что указанные различия связаны с эволюцией (или ее отсутствием) обеих групп бактерий в условиях увеличения концентрации кислорода в атмосфере и среде обитания. Первая группа смогла приспособиться к подобным условиям и одновременно выработать принципы защиты от окисления активными формами кислорода, в основ-

ном синглетного кислорода, а вторая ограничила свой ареал серной бескислородной средой.

БХл является основным пигментом пурпурных фотосинтезирующих бактерий наряду с каротиноидами (дополнительные пигменты), и оба типа пигментов локализованы в пигмент-белковых комплексах. У фотосинтезирующих бактерий в мембране обычно присутствуют три вида комплексов: два светособирающих – LH1 и LH2 и реакционный центр (РЦ). Функция комплексов LH2 и LH1 заключается в поглощении квантов света и передаче этой энергии в виде энергии электронного возбуждения к РЦ, где происходит первичное разделение зарядов (Hoff, Deisenhofer, 1997). Светособирающие комплексы – это основные комплексы в мембранах и на их долю приходится до 99% пигментов. Они построены по общему принципу из низкомолекулярных полипептидов. Основным структурным модулем этих комплексов является так называемый α/β -гетеродимер, состоящий из двух полипептидов, с которым нековалентно связаны молекулы БХл (БХл800 и БХл850 в комплексе LH2 и БХл870–890 в комплексе LH1) и молекула каротиноида (Gabrielsen et al., 2009). У несерных бактерий комплексы LH2 состоят, как правило, из 8–9, а комплекс LH1 – из 16 пар гетеродимеров соответственно. Комплекс LH2 содержит 24–27 молекул БХл и 8–9 молекул кароти-

Принятые сокращения: БХл – бактериохлорофилл, ДМ – додецил β -D-мальтопиранозид, ДФА – дифениламин, NaN₃ – азид натрия, LH – светособирающий, ДФА-образец (мембрана, комплекс) – образец, полученный из клеток, выращенных с 71 μ M ДФА, *Alc.* – *Allochrochromatium*, *Ect.* – *Ectothiorhodospira*, *Rb.* – *Rhodobacter*, *Rps.* – *Rhodospseudomonas*, *Rsp.* – *Rhodospirillum*, *Trs.* – *Thiorhodospira*, *T.* – *Thermochrochromatium*.

ноидов, а в LH1 – 32 молекулы БХл и 16 молекул каротиноидов. Недавно было показано, что комплексы LH2 из серных бактерий *Alc. vinosum* представляют более крупные структуры по сравнению с комплексами из несерных бактерий. Они построены из 12 пар гетеродимеров и содержат 36 молекул БХл и 12 молекул каротиноидов (Niedzwiedzki et al., 2012; Löhner et al., 2015). БХл850 в этих комплексах легко окисляется под действием феррицианида калия или синглетного кислорода по сравнению с комплексами из несерных бактерий (Махнева и соавт., 2016), что, по-видимому, связано с отсутствием как защитных механизмов, так и изменений в структуре, которые приводили бы к уменьшению действия окислителей.

Известно, что после поглощения молекулой БХл энергии кванта света и перехода ее в долгоживущее триплетное состояние происходит ее взаимодействие с молекулой кислорода и образование синглетного кислорода. Последний является сильным окисляющим агентом, который способен окислять не только БХл, но и другие компоненты клетки (Imlay, 2003). В последние годы повысился интерес к влиянию высоких концентраций как кислорода, так и синглетного кислорода, на рост несерных бактерий. С помощью флуоресцентных меток было показано, что синглетный кислород не только выделяется в клетках несерных бактерий на сильном свете в аэробных условиях, но и диффундирует за пределы клетки (Kochevar, 2004; Berghoff et al., 2011; Kim et al., 2013). В цитируемых работах он рассматривается не как окисляющий агент, а как сигнальная молекула, которая способна запустить синтез новых белков в клетке. В принципе прямое определение выделения синглетного кислорода пигмент-белковыми комплексами достаточно сложная задача и, например, для светособирающих бактериальных комплексов она до сих пор не решена. Установлено, что изолированные РЦ могут выделять синглетный кислород с небольшим квантовым выходом (Arellano et al., 2007; Uchoa et al., 2008). Во всех цитируемых работах объектами исследования были несерные бактерии. Работая с серными бактериями, мы пришли к выводу, что светособирающие комплексы могут быть удобным объектом для исследования разных аспектов их взаимодействия с синглетным кислородом.

Цель настоящей работы – оценить, какие тушители способны предотвращать взаимодействие синглетного кислорода с БХл850 светособирающего комплекса LH2 из клеток серной бактерии *Alc. vinosum* МГУ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования и условия культивирования. Клетки *Alc. vinosum* МГУ (старое название

Alc. minutissimum) выращивали на среде Ларсена (Кондратьева, 1972).

Для выделения пигмент-содержащих мембран клетки ресуспендировали в 0.05 М Трис-НСl-буфере (рН 8.0) и разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе УЗД2-0.1-22 (22 кГц, дважды по 60 с). Неразрушенные клетки и остатки клеточной стенки удаляли методом дифференциального центрифугирования, как описано в работе Moskalenko et al. (2005). Выделенные мембраны хранили при температуре -18°C .

Воздействие синглетным кислородом. Обычно для получения синглетного кислорода используются несколько типов фотосенсибилизаторов, которые различаются по спектрам поглощения в области 400–800 нм и квантовому выходу (~20–75%) (Redmond, Gamlin, 1999; Scholz et al., 2013). Мы использовали бенгальский розовый, так как он имеет некоторые преимущества по сравнению с другими красителями. Во-первых, он поглощает в области 440–580 нм, маскируя каротиноиды, но у него отсутствует поглощение в области продукта окисления БХл (около 700 нм), поэтому этот продукт можно легко зарегистрировать с помощью спектроскопии. Во-вторых, он имеет самый высокий (75%) квантовый выход синглетного кислорода среди других фотосенсибилизаторов (Redmond, Gamlin, 1999; Scholz et al., 2013). В-третьих, он хорошо растворяется в воде. Для облучения образцов с бенгальским розовым использовали комбинацию двух фильтров (СЗС22 + ОС13), которая позволяла выделить узкую область около 550–580 нм, где присутствует небольшое поглощение БХл и каротиноидов. Бенгальский розовый (конечная концентрация 20 мкМ) добавляли к образцу перед облучением, который затем помещали в 1 см спектрофотометрическую кювету. Все эксперименты с облучением проводились при температуре 24°C в термостатируемой ячейке осветителя ЛЭТИ с лампой КГМ 500 (500 Вт), при этом интенсивность используемого желто-зеленого света составляла (2 мВт/см^2).

Анализ пигментов проводили методом ВЭЖХ (Ashikhmin et al., 2014) на колонке Agilent Zorbax SB-C18 (“Agilent”, США). Установка для ВЭЖХ состояла из насоса LC 10ADvp с модулем FCV10 Alvp, который позволял создавать градиент растворителей со стороны низкого давления, детектора с диодной матрицей SPD-M20A и термостата СТО-20АС (“Shimadzu”, Япония). Хроматограммы, а также спектры поглощения отдельных пигментов получали с помощью программы LC-solution (“Shimadzu”, Япония).

Методы спектроскопии. Спектры оптического поглощения мембран регистрировали при комнатной температуре на спектрофотометре Cary 50 (“Varian”, Австралия).

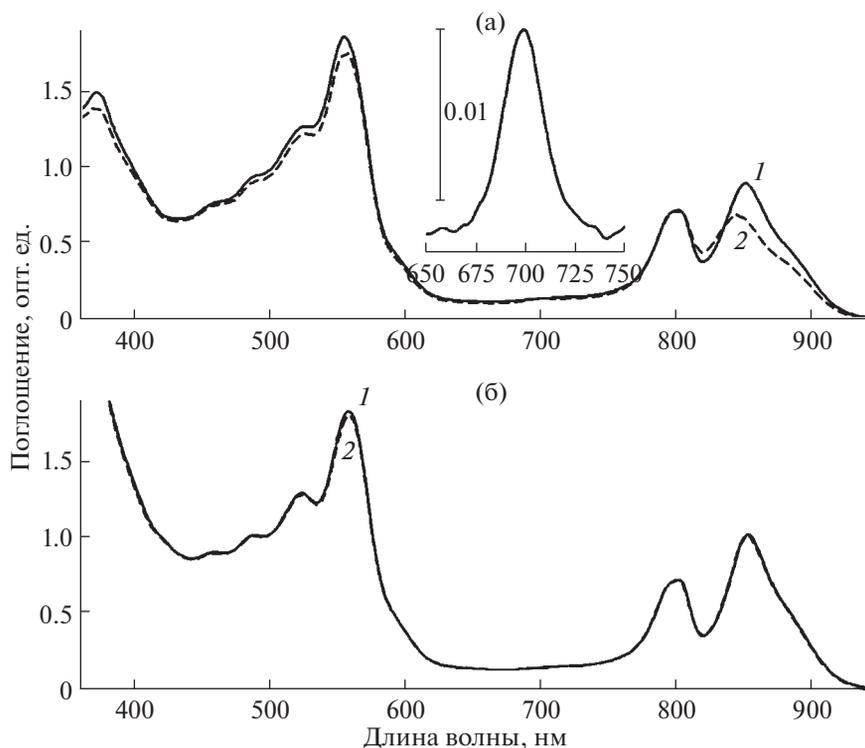


Рис. 1. Спектры поглощения мембран до освещения (1) и после 30 мин освещения (2) в присутствии 20 мкМ бенгальского розового: без других добавок (а); +100мМ аскорбата натрия (б). Вставка: часть разностного спектра поглощения “спектр (2) минус спектр (1)”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В спектре оптического поглощения мембран из клеток *Alc. vinosum* МГУ присутствуют пики при 372, 487 (плечи при 460 и 522), 590, 801 и 852 нм, которые принадлежат полосе Соре БХл, каротиноидам, Q_x и двум Q_y переходам БХл соответственно. Добавление бенгальского розового маскирует максимумы поглощения каротиноидов и Q_x переход БХл (рис. 1). При освещении мембран в присутствии бенгальского розового происходит уменьшение полосы Q_y БХл850 на 25% и ее одновременное смещение с 852 до 846 нм. Менее чем на 2% выцветает и бенгальский розовый. Максимум 3-ацетил-хлорофилла при 700 нм в спектре поглощения мембран практически не виден и проявляется только на разностных спектрах (рис. 1; спектр 2 и вставка соответственно). Следует отметить, что некоторый эффект ($>1/3$ от общего выцветания полосы БХл850) вносит непосредственно свет, используемый для облучения. Дело в том, что область, которую вырезают применяемые нами светофильтры, перекрывается с длинноволновыми склонами поглощения каротиноидов. Ранее мы показали, что эти пигменты способны под действием света инициировать фотоокисление БХл (Махнева и соавт., 2016), т.е. фактически они являются фотосенсибилизатором и дополняют работу бенгальского розового.

На рис. 2а представлены результаты разделения пигментов из контрольных мембран *Alc. vinosum* МГУ. Основными пигментами в контрольном образце являются БХл и родопин. В нем также присутствуют следы 3-ацетил-хлорофилла, что связано с отсутствием каких-либо дополнительных мер (анаэробные условия, добавление антиоксидантов) при разрушении клеток и выделении мембран. После облучения образца в присутствии бенгальского розового на хроматограмме появляется заметный пик 3-ацетил-хлорофилла (рис. 2б), что полностью совпадает со спектральными данными. В растворителях максимум поглощения и БХл и 3-ацетил-хлорофилла смещается в синюю область до 770 и 678 нм соответственно (рис. 2, вставка).

Понятно, что если заблокировать синглетный кислород, то процесс окисления БХл должен прекратиться. На рис. 1б представлены результаты подобного эксперимента в присутствии аскорбата натрия. Хорошо видно, что уменьшение (окисление) полос поглощения БХл в ближней ИК области фактически отсутствует. В разностном спектре поглощения изменения не превышают 0.02 опт. ед. (рис. 3, спектр 1), что составляет около 2%. Однако аскорбат натрия является редокс-агентом, который может восстанавливать, например, цитохром, и поэтому его действие не со-

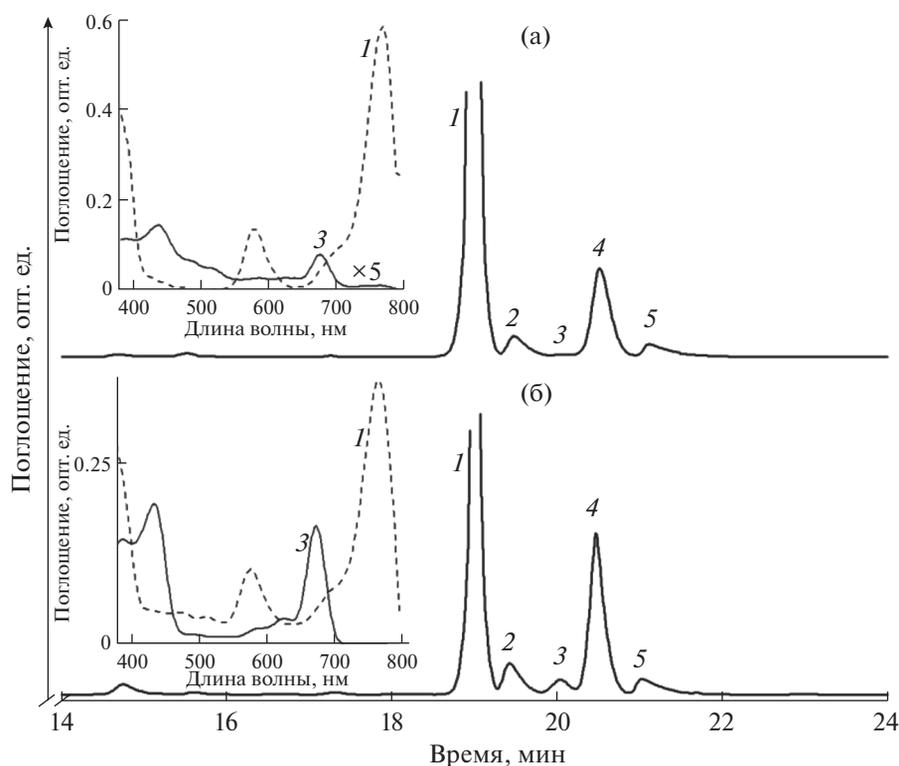


Рис. 2. Частичные хроматограммы ВЭЖХ пигментов из контрольных мембран (а) и мембран после 30 мин освещения в присутствии 20 мкМ бенгальского розового (б). Идентификация пиков: 1 – БХл, 2 – дидегидрородопин, 3 – 3-ацетил-хлорофилл, 4 – родопин, 5 – спириллоксантин. Вставка на (а) – спектры поглощения БХл (1) и 3-ацетил-хлорофилла (3, увеличен в 5 раз). Вставка на (б) – спектры поглощения БХл (1) и 3-ацетил-хлорофилла (3).

всем специфично. Другие тушители синглетного кислорода (гистидин, имидазол и тролокс) действуют также, как аскорбат натрия (рис. 3, спектры 2–4). Изменения в ИК области полос поглощения БХл в их присутствии колеблются в пределах 0.005–0.045 опт. ед. Для сравнения там же приведен разностный спектр окисления БХл в мембранах после освещения в присутствии бенгальского розового без каких-либо добавок (рис. 3, спектр б). В этом спектре наблюдаются минимум при 858 нм и максимум при 824 нм, первый из них соответствует уменьшению полосы БХл850 при окислении, а второй – смещению этой полосы в коротковолновую область. Отметим, что в присутствии тушителей выцветают более длинноволновые формы БХл (минимум при 865 нм; рис. 3, спектры 3 и 4). Одновременно в процессе освещения наблюдается небольшое выцветание полосы поглощения бенгальского розового в области 550–570 нм (рис. 3).

Все указанные тушители демонстрируют четкую зависимость уменьшения окисления БХл850 от увеличения концентрации агента (рис. 4). Максимальный эффект был достигнут при концентрации тролокса – 0.2 мМ, аскорбата 100 мМ, гистидина 100–200 мМ и имидазола – 200 мМ.

Данные, полученные с NaN_3 (рис. 3, спектр 5 и рис. 5), полностью контрастируют с описанными выше результатами для других тушителей: при концентрации 50 мМ NaN_3 практически никак не замедляет фотоокисление БХл850 (рис. 5, кривая 2), а при увеличении концентрации NaN_3 до 200 мМ отмечено только небольшое уменьшение (~3–5%) этого эффекта после 30 мин освещения. Этот факт не вписывается в общую концепцию и остается непонятным. Ранее было неоднократно показано, что NaN_3 способен тушить синглетный кислород в системе H_2O_2 – NaOCl (Bancirova, 2011) или в мицеллах и липосомах (Miyoshi, Tomita, 1979, Musbat et al., 2013). Причем эффективность тушения напрямую зависит от типа структур, в которые встраиваются мишени синглетного кислорода: в липосомах NaN_3 не взаимодействует с гидрофобными мишенями, а в мицеллах он эффективен с обоими типами мишеней (гидрофобными и гидрофильными) (Musbat et al., 2013). Исследуемые нами мембраны похожи на липосомы, они состоят из двойного слоя липидов, который пронизывают пигмент-белковые комплексы, содержащие БХл (гидрофобная мишень синглетного кислорода). В нашей работе NaN_3 не препятствовал окислению БХл850 и, соответственно, наши данные

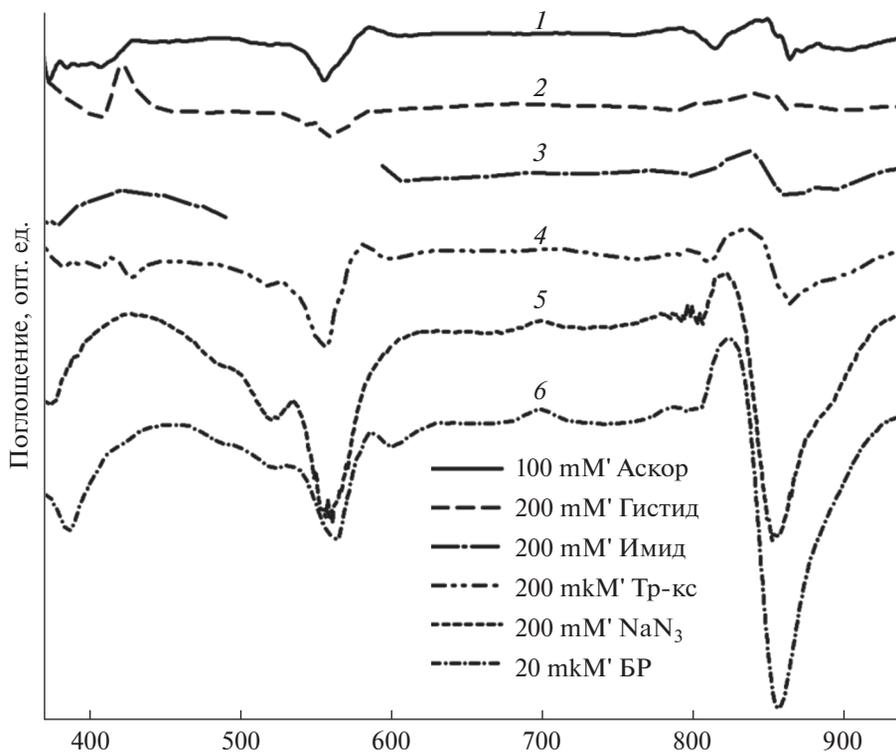


Рис. 3. Разностные спектры поглощения “спектр (2) минус спектр (1)” (см. рис. 1) в присутствии: 1 – 100 мМ аскорбата натрия, 2 – 200 мМ гистидина, 3 – 200 мМ имидазола, 4 – 200 мкМ тролокса, 5 – 200 мМ NaN₃, 6 – без добавок. Спектры сдвинуты по оси ординат, разрыв в спектре 3 (491–524 нм) связан с удаленными большими шумами.

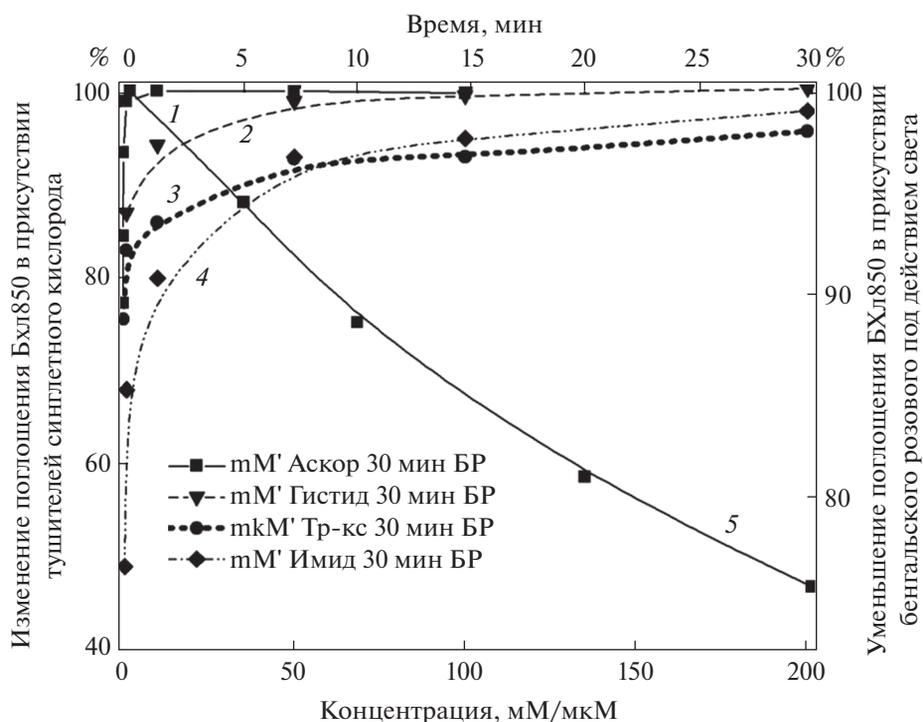


Рис. 4. Выцветание полосы БХл850 в присутствии 20 мкМ бенгальского розового в зависимости от количества добавленного тушителя: 1 – аскорбат натрия (мМ), 2 – гистидин (мМ), 3 – тролокс (мкМ), 4 – имидазол (мМ). Выцветание полосы БХл850 в присутствии 20 мкМ бенгальского розового без добавок (5).

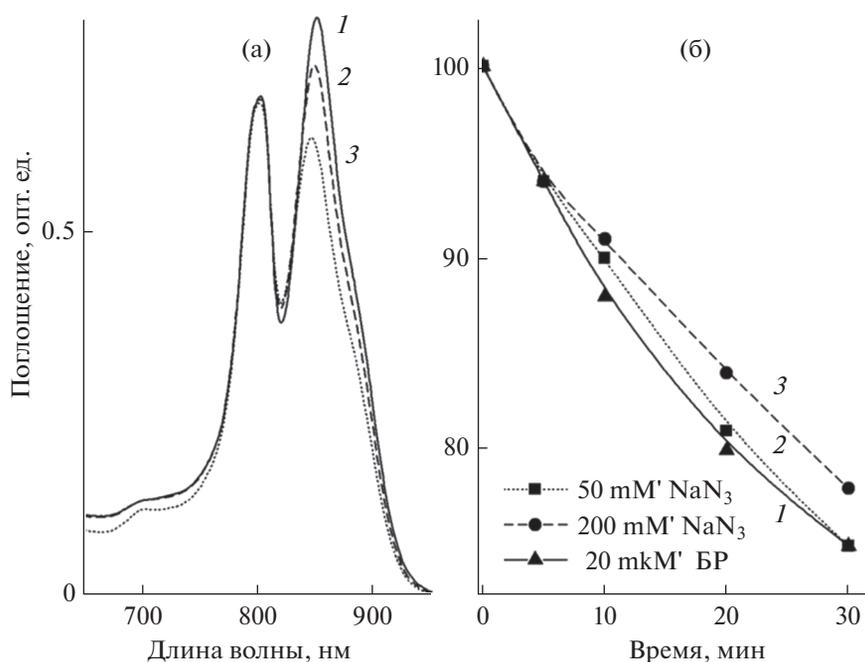


Рис. 5. (а) – Спектры поглощения мембран до освещения (1) и после 30 мин освещения в присутствии 20 мкМ бенгальского розового и 50 мМ NaN₃ (2) и 200 мМ NaN₃ (3); (б) – выцветание полосы БХл850 в присутствии 20 мкМ бенгальского розового (1), +50 мМ NaN₃ (2) и +200 мМ NaN₃ (3) в зависимости от времени освещения (0–30 мин).

совпадают с результатами работы Musbat et al. (2013). Однако остается не ясным, почему NaN₃ не может взаимодействовать с синглетным кислородом сразу после образования последнего в гидрофильной фазе.

Синглетный кислород является сильным деструктурирующим фактором, который способен окислять разные компоненты клетки, такие как липиды, белки и пигменты. Его действие обычно проверялось на модельных системах, на которых проще оценить образование новых продуктов. Например, при взаимодействии синглетного кислорода с диазокрасителями в зависимости от типа растворителя в молекулах красителей происходило образование гидроксо- или кетогрупп с возможной их последующей модификацией (Bortolus, Monti, 1989). У растительных каротиноидов типа β-каротина (а также лютеина и зеаксантина) под действием синглетного кислорода в растворителях происходило расщепление молекулы пигмента на фрагменты разной длины и образование соответствующего эндопероксида с молекулярной массой в пределах 192–416 (Rame et al., 2012). Понятно, что если бы подобный процесс происходил в наших образцах, то это привело бы к уменьшению поглощения в основной полосе каротиноидов (рис. 3) и появлению новых продуктов на хроматограммах ВЭЖХ, чего ранее мы не фиксировали (Махнева и соавт., 2009). БХл в модельных системах легко окисляется с образованием нескольких типов окисленных продуктов, включая бесцвет-

ные соединения, соединения с открытым кольцом типа билинов, хлорины и бактериохлорины (Smith, Calvin, 1966; Limantara et al., 2006). Основными продуктами окисления являются хлорины с преобладанием 3-ацетил-хлорофилла. Последний также преобладает в наших образцах, и его легко обнаружить спектрофотометрически (рис. 1 и 3) или ВЭЖХ (рис. 2). Образование указанного продукта связано с особенностью структуры молекулы БХл, у которой во втором имидазольном кольце в положении 7–8 присутствуют два свободных протона. Если они не участвуют в образовании водородной связи с аминокислотными остатками полипептидов, то при окислении происходит их отрыв от молекулы БХл с образованием двойной связи, которая изменяет систему сопряженных двойных связей. При этом длинноволновая полоса поглощения пигмента смещается на ~155 или ~90 нм в синюю область в комплексах или растворителе соответственно (рис. 1 и 2). Очевидно, что БХл в наших образцах является основной мишенью для синглетного кислорода.

В настоящей работе исследована эффективность пяти тушителей синглетного кислорода – аскорбата натрия, гистидина, имидазола, тролокса и азиды натрия – на нейтрализацию действия синглетного кислорода на БХл в светособирающих комплексах мембран *Alc. vinosum* МГУ, и все они, за исключением азиды натрия, показали свою эффективность. Указанные тушители, наряду с другими: β-каротин, α-токоферол, аскорбиновая

кислота, кверцитин, бутилгидроксианизол, бутилгидрокситолуен, тетрабутилгидрохинон, бетаин, 1,4-диазабицикло[2.2.2]октан и т.д. — широко используются в опытах с синглетным кислородом (Gutiérrez et al., 2001; Dad et al., 2006; Yettella, Min, 2008; Fatima et al., 2016; Wendel et al., 2016). Например, в работе Fatima et al. (2016) наиболее эффективными были β-каротин, α-токоферол, аскорбиновая кислота и кверцитин. Авторы регистрировали выцветание нитрозодиметиланилина в присутствии синглетного кислорода, который генерировался в системе ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HOCl} \rightarrow \text{HCl} + \text{H}_2\text{O} + {}^1\text{O}_2$). Результаты цитируемой работы (в части совпадающих тушителей) отличаются от полученных нами данных. При одинаковых концентрациях тушителей в нашей работе тролокс (0.1 мМ) был эффективнее в ~2.8 раза, аскорбат (0.1 мМ) — в ~1.6 раза, имидазол (50 мМ) — в ~2 раза и гистидин (50 мМ) — в ~1.9 раза по сравнению с данными Fatima et al. (2016). Такие различия достаточно сложно объяснить, возможно, они связаны с тем, что в этой работе (Fatima et al., 2016) в состав реакционной смеси входила перекись водорода (200 мМ), которая могла дополнительно окислять нитрозодиметиланилин. Ранее мы показали, что перекись действует на БХЛ *Alc. vinosum* МГУ также, как химический окислитель или синглетный кислород (Москаленко, 1974).

Долгое время синглетный кислород считался сильным повреждающим фактором, способным нарушать работу отдельных компартментов клетки (Gorman, Rodgers, 1992). Однако в последние годы его также рассматривают как сигнальную молекулу (Kochevar, 2004; Glaeser, Klug, 2004; Berghoff et al., 2011). Понятно, что в первом случае на клетку воздействуют “кислородный стресс”, т.е. высокие концентрации синглетного кислорода. Они генерируются за счет внешнего фактора или после разрушения отдельных пигмент-белковых комплексов и появления мономерного БХЛ, который является сильным сенсбилизатором синглетного кислорода. Впервые этот эффект наблюдался в работе (Griffith et al., 1955) и был ошибочно приписан защитной функции каротиноидов. Низкие концентрации синглетного кислорода могут образовываться непосредственно в клетке (Berghoff et al., 2011). Время жизни синглетного кислорода резко возрастает при переходе от воды к фосфолипидам (мембранам) и предполагается, что при тесном контакте клеток друг с другом он может переходить (диффундировать) от клетки к клетке (Maisch et al., 2007).

В настоящее время существует несколько методов определения генерации или присутствия синглетного кислорода в образце: 1). Прямое определение синглетного кислорода по его фосфоресценции при 1260 нм. Этим методом показано выделение синглетного кислорода реакцион-

ными центрами бактерий (Arellano et al., 2007; Uchoa et al., 2008). 2). Косвенное определение синглетного кислорода с помощью ловушек типа гистидина или имидазола. Основано на эффекте связывания образовавшегося синглетного кислорода ловушкой и уменьшения общей концентрации кислорода в ячейке, которая измеряется с помощью электрода Кларка (Kraljic, Mohsni, 1978). 3). Использование флуоресцентных ловушек типа Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG), которые, связывая синглетный кислород, переходят во флуоресцирующую форму с испусканием в области 510–550 нм (Berghoff et al., 2011), т.е. для их детектирования можно использовать стандартный спектрофлуориметр. Однако для SOSG, как и для других датчиков на основе флуоресцеина, существует как возможность фоторазложения, так и прямой генерации синглетного кислорода (Kim et al., 2013).

Таким образом, в работе изучено действие синглетного кислорода на мембраны *Alc. vinosum* МГУ, который генерировался бенгальским розовым под действием света (547–600 нм), без тушителя и в присутствии тушителей синглетного кислорода. В системе без тушителя происходило выцветание полосы БХЛ850 светособирающего комплекса LH2, и появлялся пик поглощения в области 698 нм, принадлежащий окисленному продукту 3-ацетил-хлорофиллу. Изучена эффективность пяти тушителей синглетного кислорода — аскорбата Na, гистидина, имидазола, тролокса и NaN_3 — на нейтрализацию действия синглетного кислорода на бактериохлорофил (БХЛ) светособирающих комплексов в мембранах *Alc. vinosum* МГУ, и все они, за исключением азида натрия, успешно нейтрализовали это действие.

Примененный в данной работе подход является простым методом детектирования синглетного кислорода по изменениям в спектре поглощения мембран *Alc. vinosum* МГУ. Они будут использованы при исследовании разных аспектов взаимодействия синглетного кислорода с пигментами фотосинтезирующих бактерий.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (проекты № 18-04-00684_а; 18-34-00416_мол_а; 17-04-00929_а). Представленные на рис. 1–3 результаты получены в рамках государственного задания № АААА-А17-117030110140-5.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кондратьева Е.Н. Фотосинтезирующие бактерии и бактериальный фотосинтез. М.: Изд-во МГУ, 1972. С. 75.
- Kondratyeva Ye.N. Photosynthesizing Bacteria. USSR Academy of Sciences Publishers, Moscow. 1972. P. 75. (in Russian).
- Махнева З.К., Ашихмин А.А., Большаков М.А., Москаленко А.А. Образование 3-ацетил-хлорофилла в свето-

- собирающих комплексах пурпурных бактерий при химическом окислении // Биохимия. 2016. Т. 81. № 2. С. 282–294.
- Makhneva Z.K., Ashikhmin A.A., Bolshakov M.A., Moskalenko A.A.* 3-Acetyl-chlorophyll formation in light harvesting complexes of purple bacteria by chemical oxidation // Biochemistry (Moscow). 2016. V. 81. P. 176–186.
- Махнева З.К., Большаков М.А., Ашихмин А.А., Ерохин Ю.Е., Москаленко А.А.* Влияние синего света на стабильность структуры антенных комплексов из *Allochro-matium minutissimum* с разным содержанием каротиноидов // Биол. мембраны. 2009. Т. 26. № 3. С. 188–193.
- Makhneva Z.K., Bolshakov M.A., Ashikhmin A.A., Erokhin Y.E., Moskalenko A.A.* Influence of blue light on the structure stability of antenna complexes from *Allochro-matium minutissimum* with different content of carotenoids // Biochemistry-Moscow Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. 2009. V. 3. № 2. P. 123–127.
- Москаленко А.А.* Пигмент-белковые комплексы и их взаимодействие в структурах фотосинтетического аппарата бактерий и растений. Дисс. ... докт. биол. наук в форме научного доклада. ИПФС РАН. Пущино. 1993. 37 с.
- Arellano J.B., Yousef Y.A., Melø T.B., Mahamad S.B., Cogdell R.J., Naqvi K.R.* Formation and geminate quenching of singlet oxygen in purple bacterial reaction center // J. Photochem. Photobiol. 2007. V. 87. P. 105–112.
- Ashikhmin A., Makhneva Z., Moskalenko A.* The LH2 complexes are assembled in the cells of purple sulfur bacterium *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* with inhibition of carotenoid biosynthesis // Photosynth. Res. 2014. V. 119. P. 291–303.
- Bancirova M.* Sodium azide as a specific quencher of singlet oxygen during chemiluminescent detection by luminol and Cypridina luciferin analogues // Luminescence. 2011. V. 26. P. 685–688.
- Berghoff B.A., Glaeser J., Nuss A.M., Zobawa M., Lottspeich F., Klug G.* Anoxygenic photosynthesis and photooxidative stress: a particular challenge for *Roseobacter* // Environ. Microbiol. 2011. V. 13. P. 775–791.
- Bortolus P., Monti S.* Physical quenching and chemical reaction of singlet molecular oxygen with Azo dyes // J. Organic. Chem. 1989. V. 54. P. 534–540.
- Dad S., Bisby R.H., Clark I.P., Parker A.W.* Formation of singlet oxygen from solutions of vitamin E // Free Radic. Res. 2006. V. 40. P. 333–338.
- Fatima K., Masood N., Luqman S.* Quenching of singlet oxygen by natural and synthetic antioxidants and assessment of electronic UV/Visible absorption spectra for alleviating or enhancing the efficacy of photodynamic therapy // Biomed. Res. Therapy. 2016. V. 3. P. 514–527.
- Gabrielsen M., Gardiner A.T., Cogdell R.J.* Peripheral complexes of purple bacteria // Advances in Photosynthesis and Respiration / Eds. Hunter C.N., Daldal F., Thurnauer M.C., Beatty J.T. The Purple Phototrophic Bacteria. Dordrecht: Springer, 2009. V. 28. P. 135–153.
- Glaeser J., Klug G.* Photo-oxidative stress in *Rhodobacter sphaeroides*: protective role of carotenoids and expression of selected genes // Microbiology (SGM). 2005. V. 151. P. 1927–1938.
- Gorman A.A., Rodgers M.A.J.* Current perspectives of singlet oxygen detection in biological environments // J. Photochem. Photobiol. 1992 B: Biol. V. 14. P. 159–176.
- Griffith M., Sistrom W.R., Cohen-Bazire G., Stanier R.Y.* Functions of carotenoids in photosynthesis // Nature. 1955. V. 176. P. 1211–1214.
- Gutiérrez I., Criado S., Bertolotti S., Norman A., Garcia N.* Dark and photoinduced interactions between trolox, a polar-solvent-soluble model for vitamin E, and riboflavin // J. Photochem. Photobiol. 2001. V. 62. P. 133–139.
- Hoff A.J., Deisenhofer J.* Photophysics of photosynthesis. Structure and spectroscopy of reaction centers of purple bacteria // Physics Rep. 1997. V. 287. P. 1–247.
- Imlay J.A.* Pathways of oxidative damage // Annu. Rev. Microbiol. 2003. V. 57. P. 395–418.
- Kim S., Fujitsuka M., Majima T.* Photochemistry of singlet oxygen sensor green // J. Phys. Chem. B. 2013. V. 117. P. 13985–13992.
- Kochevar I.E.* Singlet oxygen signaling: from intimate to global // Sci. STKE. 2004. V. 2004. P. 1–3.
- Kraljic I., Mohsni S.E.L.* A new method for the detection of singlet oxygen in aqueous solutions // Photochem. Photobiol. 1978. V. 28. P. 577–581.
- Krieger-Liszka A., Trebst A.* Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre // J. Exp. Botany. 2006. V. 57. P. 1677–1684.
- Limantara L., Koehler P., Wilhelm B., Robert J., Porra R.J., Scheer, H.* Photostability of bacteriochlorophyll a and derivatives: potential sensitizers for photodynamic tumor therapy // Photochem. Photobiol. 2006. V. 82. P. 770–780.
- Löhner A., Carey A.M., Hacking K., Picken N., Kelly S., Cogdell R., Köhler J.* The origin of the split B800 absorption peak in the LH2 complexes from *Allochro-matium vinosum* // Photosynth. Res. 2015. V. 123. P. 23–31.
- Maisch T., Baier J., Franz B., Maier M., Landthaler M., Szeimies R.M., Bäuml W.* The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 7223–7228.
- Miyoshi N., Tomita G.* Quenching of singlet oxygen by sodium azide in reversed micellar systems // Z. Naturforsch. 1979. V. 34b. P. 339–343.
- Moskalenko A.A., Makhneva Z.K., Fiedor L., Scheer H.* Effects of carotenoid inhibition on the photosynthetic RC–LH1 complex in purple sulphur bacterium *Thiorhodospira sibirica* // Photosynth. Res. 2005. V. 86. P. 71–80.
- Musbat L., Weitman H., Ehrenberg B.* Azide quenching of singlet oxygen in suspensions of microenvironments of neutral and surface charged liposomes and micelles // Photochem. Photobiol. 2013. V. 89. P. 253–258.
- Niedzwiedzki D.M., Bina D., Picken N., Honkanen S., Blankenship R.E., Holten D., Cogdell R.J.* Spectroscopic studies of two spectral variants of light-harvesting complex 2 (LH2) from the photosynthetic purple sulfur bacterium *Allochro-matium vinosum* // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1817. P. 1576–1587.
- Ohara K., Kikuchi K., Origuchi T., Nagaoka S.* Singlet oxygen quenching by trolox C in aqueous micelle solutions // J. Photochem. Photobiol. 2009. B. V. 97. P. 132–137.

- Rame F., Birtic S., Cuiné S., Christian Triantaphylidés C., Ravanat J.L., Havaux M. Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants // *Plant Physiol.* 2012. V. 158. P. 1267–1278.
- Redmond R.W., Gamlin J.N. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules // *Photochem. Photobiol.* 1999. V. 70. P. 391–475.
- Scholz M., Roman Dedic R., Breitenbach T., Hala J. Singlet oxygen-sensitized delayed fluorescence of common water-soluble photosensitizers // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2014. V. 13. P. 1203–1212.
- Smith J.R., Calvin M. Studies on the chemical and photochemical oxidation of bacteriochlorophyll // *J. Am. Chem. Soc.* 1966. V. 88. P. 4500–4506.
- Takaichi S. Distribution and biosynthesis of carotenoids // *The Purple Phototrophic Bacteria* / Eds. Daldal F., Thurman M.C., Beatty J.T., Hunter C.N. New York: Springer, 2009. P. 97–117.
- Uchoa A.F., Knox P.P., Turchielle R., Seifullina N.Kh., Baptista S.M. Singlet oxygen generation in the reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* // *Eur. Biophys.* 2008. V. 37. P. 843–850.
- Wendel M., Nizinski S., Gierszewski M., Prukala D., Sikorski M., Starzak K., Wybraniec S., Burdzinski G. Chemical quenching of singlet oxygen by betanin // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2016. V. 15. P. 872–878.
- Yettella R.R., Min D.B. Quenching mechanisms and kinetics of trolox and ascorbic acid on the riboflavin-photosensitized oxidation of tryptophan and tyrosine // *J. Agric. Food Chem.* 2008. V. 56. P. 10887–10892.

Quenchers Protect BChl850 from Action of Singlet Oxygen in the Membranes of a Sulfur Photosynthetic Bacterium *Allochromatium vinosum* Strain MSU

Z. K. Makhneva¹, A. A. Ashikhmin¹, M. A. Bolshakov¹, and A. A. Moskalenko¹, *

¹*Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia*

*e-mail: lfbv22@gmail.com

Received July 3, 2018

Revised September 20, 2018

Accepted October 2, 2018

Abstract—The effect of singlet oxygen was studied in the system of *Allochromatium (Alc.) vinosum* MSU membranes, rose bengal, and light (547–600 nm) with and without a quencher. In the system without a quencher, bleaching of the BChl850 band of the LH2 light-harvesting complex was observed and an absorption peak emerged at 698 nm, which belonged to the oxidized product, 3-acetyl-chlorophyll. The efficiency of five quenchers of singlet oxygen for neutralization of the effect of singlet oxygen on bacteriochlorophyll in the light-harvesting complexes of the membranes *Alc. vinosum* MSU was studied: sodium ascorbate, histidine, imidazole, trolox, and sodium azide. All of them, with the exception of sodium azide, neutralized successively the effect of singlet oxygen.

Keywords: photosynthetic bacteria, photosynthesis, LH2 and LH1 complexes, singlet oxygen, 3-acetyl-chlorophyll, singlet oxygen quenchers