

проведен количественный анализ скоростей прямых и обратных электронных переходов в молекуле триптофана из возбужденного состояния в основное состояние и в состояние с переносом заряда (CTS). Исходя из полученных в работе экспериментальных и теоретических данных были выделены три области в спектре флуоресценции Trp: коротковолновая область (300 нм <math>< 386</math> нм), промежуточная область (386 нм <math>< 400</math> нм) и длинноволновая область (400 нм <math>< 470</math> нм), для которых температурная зависимость скорости образования CTS имеет различный характер. Показана ключевая роль структурных перестроек в системе водородных связей, определяющих нелинейный характер изменения параметров флуоресценции триптофана в выделенных спектральных областях

Выявленный нелинейный характер зависимости времени затухания быстрых (t_1 , единицы нс) и медленных (t_2 , около 10 нс) компонент флуоресценции водного раствора молекул триптофана от температуры объяснен возникновением дополнительного канала дезактивации Trp* - переносом электрона от индольной части молекулы триптофана на водородные связи водного окружения и затем на ее амидные группы. В результате образуется состояние с переносом заряда Trp+R-. Дезактивация этого CTS происходит как в результате обратного перехода из данного состояния в возбужденное состояние Trp, так и за счет либо флуоресценции, либо в процессе тепловой релаксации в основное состояние.

Использованный в работе спектрально-динамический подход при исследовании температурных зависимостей скоростей дезактивации возбужденных состояний Trp позволил также обнаружить возникновение конформационных (фазовых) переходов в системе водородных связей в окружении Trp* и CTS в температурном диапазоне от -80°C до 20°C . В этом температурном диапазоне наблюдается нелинейное поведение таких параметров, как t_1 , t_2 , энергии активации E_a , а также скорости сольватационного сдвига спектров флуоресценции. Важно отметить, что в диапазоне температур -110°C - -80°C молекула Trp* сольватируется быстрее, чем CTS, тогда как при более высоких температурах ($T > -80^{\circ}\text{C}$) скорость сольватации состояния Trp*+R- становится больше, чем скорость сольватации Trp*. Этот факт объяснен нами тем, что в температурном диапазоне -80°C - 20°C в окружении CTS структурный (фазовый) переход захватывает большее число Н-связей, чем в окружении Trp*. Именно в температурном диапазоне -80°C - 20°C происходит отступление температурной динамики переходов возбужденной молекулы триптофана от стандартного Аррениусовского поведения с постоянным значением E_a . Таким образом, динамика системы водородных связей играет определяющую роль в возникновении нелинейного характера изменения параметров, описывающих дезактивацию Trp* и CTS. Очевидно, что дальнейшее сопоставление данных результатов с аналогичными исследованиями для триптофанилов в составе белков позволит получать новую информацию о том, в какой степени различия в параметрах флуоресценции триптофана в составе функционального белка, выявляемые при размораживании охлажденных в различных условиях образцов, могут быть обусловлены непосредственными изменениями в характере его взаимодействия с белковыми молекулами и с окружающим растворителем.

Влияние длины волны, мощности и экспозиции лазерного излучения на генерацию синглетного кислорода

Маковик И.Н.^{1*}, Винокуров А.Ю.¹, Ератова Л.В.¹, Дрёмин В.В.¹
¹Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева;
irina.makovik@gmail.com

Синглетный кислород (СК) является высокореакционной формой молекулярного кислорода и играет важную роль во многих физических, химических и биологических процессах, а также в терапии различных патологий. Повышение интереса к СК вследствие его высокой химической активности способствовало разработке различных подходов к его генерации в биологических средах. Так, в последнее время активно изучается механизм прямой оптической генерации СК светом определённых длин волн без использования фотосенсибилизаторов. Наравне с исследованием влияния лазерно-индуцированного СК на протекание физиологических процессов на клеточном и тканевом уровнях активно разрабатываются и изучаются подходы к его обнаружению и количественному определению. Это является важной задачей для оценки эффективных доз и поиска оптимальных параметров возбуждения триплетного кислорода. В этой работе изучена влияние ряда длин волн, мощностей и экспозиций лазерного излучения на генерацию СК, а также проанализированы преимущества и недостатки существующих подходов к количественному измерению образования СК.

На сегодняшний день из-за высокой реакционной способности СК существует ограниченное количество возможных подходов к его детектированию. В работе рассмотрены полярографический метод с использованием респирометра Oxytherm+R (Hansatech Instruments, Великобритания) и метод с применением флуоресцентного зонда Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG, Invitrogen, США). Поскольку основное триплетное состояние кислорода имеет несколько полос поглощения в спектральном диапазоне от 390 нм до 1300 нм, при которых

возможно образование СК, рассмотрены длины волн лазерного излучения 1267 нм и 1064 нм. Данные длины волн обладают наибольшим поглощением триплетной формой кислорода. В работе источники лазерного излучения 1244 нм и 1122 нм использованы в качестве контрольных, которые, по литературным данным, не активируют переход триплетного кислорода в синглетное состояние.

Исследование полярографическим методом включало измерение уровня растворённого кислорода в ddH₂O и 5 мМ растворе L-гистидина в ddH₂O. L-гистидин использован в качестве «химической ловушки» благодаря его способности к взаимодействию с СК, что делало возможным полярографическое измерение снижения концентрации растворённого кислорода. Лазерно-индуцированная генерация СК осуществлялась через стеклянную стенку измерительной камеры, в которой поддерживалась температура 26 °С. Измерение с применением селективного флуоресцентного зонда SOSG осуществлялось с использованием микроскопа Zeiss LSM 900 (Carl Zeiss AG, Германия) с объективом 10×. Для возбуждения флуоресценции зонда использовался лазер с длиной волны 488 нм и мощностью 0,1 % от максимальной. Подача лазерного излучения в ходе экспериментов осуществлялась с противоположной стороны от объектива микроскопа. Протокол включал этапы регистрации базового уровня сигнала (3 мин), уровня сигнала в процессе генерации СК лазерным излучением (длительность зависела от выбранной дозы), а также регистрацию сигнала после воздействия (6 мин). Анализ влияния факторов времени (экспозиции лазерного излучения) и мощности на образование СК осуществлялся при воздействии различных доз (50, 100, 150, 200 и 250 Дж/см²) лазерного излучения при фиксированном значении мощности 50 мВт, а также для дозы 200 Дж/см² при различных мощностях равных 50, 100 и 150 мВт.

Анализ результатов измерений полярографическим методом показал, что содержание растворённого кислорода в растворе L-гистидина в измерительной камере после воздействия излучением на длинах волн 1267 нм и 1064 нм оказалось ниже по сравнению с контрольными лазерами. Однако, несмотря на показанные различия между исследуемыми лазерами, данный подход характеризуется недостаточной чувствительностью к детектированию различных доз генерируемого СК. Кроме того, чувствительность полярографического метода к изменению температуры даже при её стабилизации, предусмотренной конструкцией респирометра, делает невозможным анализ изменения сигнала в момент лазерного воздействия. Поэтому можно сделать лишь косвенную оценку после расчёта конечного снижения концентрации кислорода по сравнению с исходным её уровнем до воздействия.

Измерения с применением SOSG показали, что воздействие излучением 1267 и 1064 нм приводит к усилению интенсивности зелёной флуоресценции окисленной формы данного зонда. Прирост сигнала свидетельствует о продукции СК и его селективном взаимодействии с SOSG. При этом длина волны 1267 нм оказывает более значительное влияние. Увеличение интенсивности флуоресценции зарегистрировано и при воздействии излучением с длиной волны 1244 нм, что может указывать на образование СК и некорректное его использование в качестве контрольного лазера. Анализ результатов при воздействии различных доз излучения показал чувствительность подхода к различиям в количестве генерируемого СК. Воздействие мощностями 50, 100 и 150 мВт дозой 200 Дж/см² выявило большее влияние на количество выработанного СК фактора времени воздействия, чем мощности, что вероятнее всего связано с малым временем жизни СК.

Рассмотренные подходы к обнаружению лазерно-индуцированного СК характеризуются разной чувствительностью к его обнаружению. Данные методы позволяют осуществить лишь косвенную оценку и не могут обеспечить контроль и управление генерацией СК в процессе лазерного воздействия. В случае полярографического метода можно измерить только образующийся в растворе или диффундирующий из ткани СК. Но последнее представляется невозможным из-за малого времени жизни СК. Применение SOSG существенно ограничено его низкой проникающей способностью через клеточную мембрану. Всё это указывает на необходимость разработки новых высокочувствительных методов детекции СК.

Работа выполнена при поддержке РФФИ в рамках проектов №22-75-10088 (дизайн эксперимента, разработка лазерных источников, определение чувствительности методов обнаружения СК) и №21-75-00086 (анализ дозозависимого эффекта при воздействии лазером с длиной волны 1267 нм).

Влияние отсутствия α -карбоангидразы 2 на state transitions в растениях *Arabidopsis thaliana*

Надеева Е.М.^{1*}, Игнатова Л.К.¹, Руденко Н.Н.¹, Иванов Б.Н.¹, Ветошкина Д.В.¹

¹Институт фундаментальных проблем биологии РАН - обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН;

zhurikova-alena@yandex.ru

«State transitions» (ST) представляет собой механизм акклимации, при котором происходит перераспределение поглощенной энергии возбуждения между двумя фотосистемами (ФС) за счет обратимой