

УДК 577.344.2:582.282.2

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ДРОЖЖЕЙ В ВИДИМОЙ ОБЛАСТИ СПЕКТРА

© 2012 Е.В. Пиняскина

Прикаспийский институт биологических ресурсов ДНЦ РАН, г. Махачкала

Поступила в редакцию 05.05.2012

Зарегистрирована флуоресценция изолированных плазматических мембран дрожжей с максимумом при 683 нм, которая обусловлена мембранно-связанным соединением, поглощающим в видимой области спектра. Спектр возбуждения флуоресценции этого соединения имеет структуру, типичную для порфиринов. Вместе с тем по ряду флуоресцентных свойств порфирина, локализованный в плазматической мембране, отличается от других внутриклеточных порфиринов (протопорфирин, копропорфирин).

Ключевые слова: *флуоресценция, плазматические мембраны, дрожжи, порфирины*

В последнее время все большее внимание уделяется фотодинамическим деструктивным реакциям, протекающим в биологических системах под действием света длинноволновой ультрафиолетовой (УФ) и видимой областей спектра. Это вызвано, с одной стороны, важной ролью фотодинамических процессов в реализации фототоксических и фотоканцерогенных эффектов в коже человека при действии солнечного излучения, а с другой – участием таких процессов в направленном повреждении клеток при фототерапии опухолей видимым светом в присутствии сенсibilизаторов порфириновой природы. Механизмы индуцируемых видимым светом фотодинамических реакций наиболее детально исследуются в условиях облучения биологических объектов с добавленными порфиринами, и в этом направлении достигнуты определенные успехи. Что касается фотодинамических эффектов, сенсibilизируемых эндогенными порфиринами, то о молекулярных механизмах, лежащих в основе таких эффектов, известно пока очень мало. Это в значительной мере связано с отсутствием данных о внутриклеточной локализации порфиринов, выступающих в качестве сенсibilизаторов.

В проведенных нами ранее экспериментах было показано, что в дрожжевых клетках фотоиндуцированная защитная система опосредует реакции, приводящие к устранению не только разных типов повреждений ДНК, индуцированных ультрафиолетом, но и фото-

повреждений, образующихся по фотодинамическому механизму в плазматических мембранах при облучении дрожжевых клеток большими дозами видимого света [1-3]. Спектр действия фотовосстановления инактивированных клеток имел сложную структуру с главным максимумом в красной области при 680 нм, что отличало его от известных ранее спектров действия процессов фотореактивации и фотозащиты.

Из полученного нами спектра действия ФР680 (рис. 1) следует, что первичный фоторецептор фотоиндуцибельной защитной системы должен поглощать в видимом диапазоне спектра с выраженным максимумом в красной области при 680 нм. Поэтому для определения фоторецептора мы провели поиск внутриклеточного соединения, которое имело бы поглощение в длинноволновой видимой области спектра, используя абсорбционный и спектрофлуориметрический анализ различных клеточных фракций.

Поскольку ранее было установлено, что в изолированных дрожжевых ядрах не содержатся хромофоры, поглощающие в видимой области спектра, мы провели анализ других клеточных структур, а именно: изолированных плазматических мембран и митохондрий, а также клеточной растворимой фракции. При анализе растворимой фракции, полученной после центрифугирования (15000 g x 20 мин) изолированных сферопластов *C.guilliermondii*, зарегистрированы спектры поглощения и флуоресценции, характерные для НАДН и соединений флавиновой природы, которые ограничивались сине-зеленой областью видимого спектра. Более длинноволнового поглощения и флуоресценции мы не наблюдали.

Пиняскина Елена Владимирович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экологической биофизики. E-mail: elpin1@rambler.ru

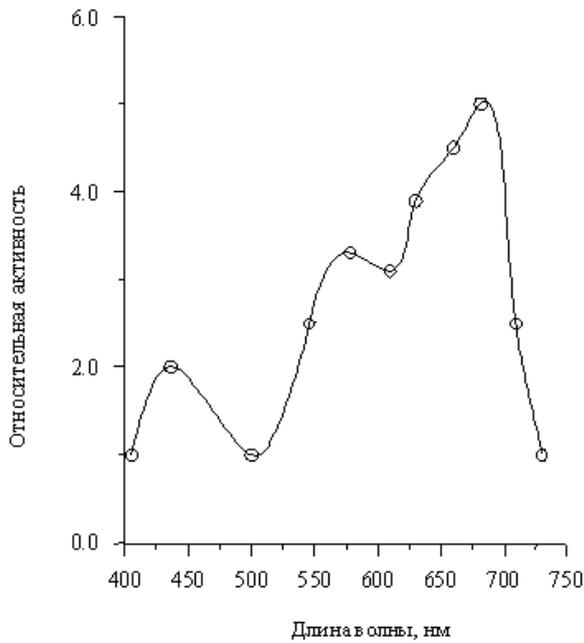


Рис. 1. Спектр действия фотореактивации клеток, инактивированных УФ-излучением

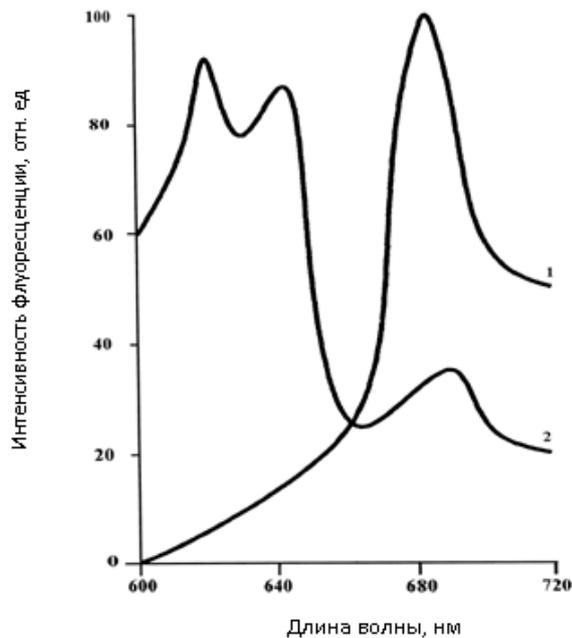


Рис. 2. Спектры флуоресценции изолированных плазматических мембран (1) и целых клеток (2) Длина волны возбуждения 410 нм

Спектрофлуориметрический анализ изолированных плазматических мембран выявил одно соединение, флуоресцирующее в красной области спектра с максимумом ~685 нм. Были зарегистрированы спектры флуоресценции этого соединения, экстрагированного из плазматических мембран в этилацетат и хлороформ, с максимумами соответственно при 675 и 670 нм (рис. 3), а также спектр возбуждения флуоресценции с основным максимумом при

410 нм и четыремя менее интенсивными пиками в области 500-630 нм, что характерно для соединений порфириновой природы [4]. Типичную для порфиринов структуру обнаруживает спектр поглощения флуоресцирующего соединения, экстрагированного из плазматических мембран в этилацетат.

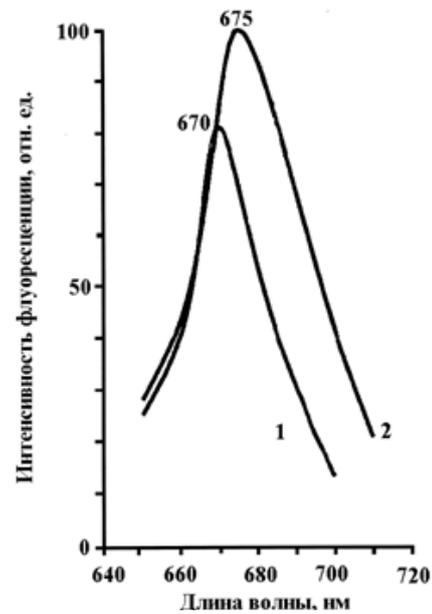


Рис. 3. Спектр возбуждения флуоресценции этилацетатного экстракта (1) и хлороформного (2) изолированных плазматических мембран. Длина волны возбуждения 410 нм

Сопоставление спектра поглощения со спектром действия фотовосстановления дрожжевых клеток (см. рис. 1) показывает, что это соединение не может претендовать на роль первичного фоторецептора обнаруженной нами фотоиндуцированной защитной системы. В отличие от спектра поглощения этилацетатного экстракта в спектре поглощения хлороформного экстракта из плазматических мембран обнаруживается максимум в более длинноволновой красной области при 670 нм (рис. 4), где порфириновое соединение уже не поглощает. Следовательно, поглощение с максимумом при 670 нм принадлежит какому-то другому соединению, которое экстрагируется из плазматических мембран в хлороформ, но не в этилацетат. Наиболее вероятно, что это соединение имеет поглощение и в области 400-650 нм. В пользу этого может указывать искаженная структура спектра поглощения порфиринового соединения в хлороформе (см. рис. 2 и 3) вследствие наложения спектров двух различных соединений. Нам не удалось зарегистрировать флуоресценцию соединения с длинноволновым максимумом поглощения при 670 нм ни в хлороформном экстракте, ни в изолированных плазматических мембранах.

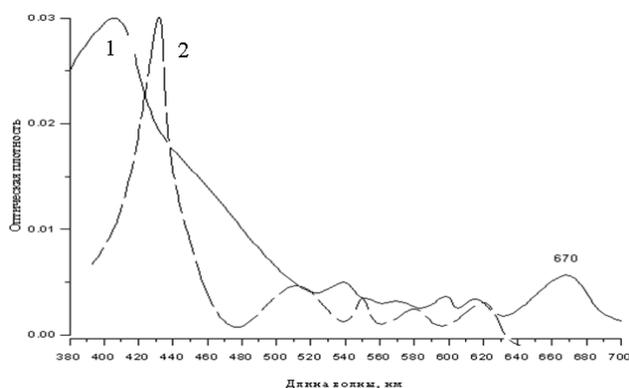


Рис. 4. Спектр поглощения хлороформного (1) и этилацетатного (2) экстрактов из изолированных плазматических мембран

Обращает на себя внимание тот факт, что длинноволновый максимум в спектре поглощения нефлуоресцирующего соединения близко совпадает с главным максимумом в спектре действия фотореактивации (~680 нм – смотри рис. 1). Это позволяет рассматривать данное соединение в качестве кандидата на роль первичного фоторецептора обнаруженной нами фотоиндуцированной защитной системы. Последующий анализ, проведенный с изолированными митохондриями, показал, что в спектре поглощения их хлороформного экстракта отсутствует длинноволновый максимум при 670 нм и этот спектр является типичным для порфиринов. На основании данных спектрофлуориметрических измерений содержащийся

в митохондриях порфирин может быть отнесен к протопорфируну.

Выводы: в результате проведенного анализа нами обнаружены два связанных с плазматическими мембранами соединения: одно – флуоресцирующее порфириновой природы и второе – нефлуоресцирующее с максимумом поглощения при 670 нм, которое может выступать в качестве первичного фоторецептора обнаруженной нами ранее фотоиндуцированной защитной системы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Фрайкин, Г.Я.* Новая фотоиндуцибельная защитная система в клетках *Candida guilliermondii* при летальном действии средневолнового ультрафиолетового излучения / *Г.Я. Фрайкин, Е.В. Пиняскина, М.Г. Страховская, А.Б. Рубин* // Доклады РАН. 1995. Т. 343, № 2. С. 265-267.
2. *Пиняскина, Е.В.* Индуцированное красным светом восстановление жизнеспособности дрожжей при фотодинамическом действии оптического излучения / *Е.В. Пиняскина, Н.С. Беленикина, Г.Я. Фрайкин, А.Б. Рубин* // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2007. №1. С. 31-34.
3. *Пиняскина, Е.В.* Реактивирующее и протекторное действие красного света на дрожжевые клетки, инактивированные UVC-излучением // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2010. Т. 12, № 1(3). С. 795-797.
4. *Юденфренд, С.* Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. – М.: Мир, 1965. 484 с.

SPECTRAL RESEARCHES OF YEAST ISOLATED PLASMATIC MEMBRANES IN THE VISIBLE RANGE OF SPECTRUM

© 2012 E.V. Pinyaskina

Near-Caspian Institute of Biological Resources DSC RAS, Makhachkala

It was registered the fluorescence of yeast isolated plasmatic membranes with maximum at 683 nanometers, caused by the membranous bound connection absorbing in the visible range of spectrum. The spectrum of initiation the fluorescence of this compound has the structure typical for porphyrins. At the same time on a number of fluorescent properties the porphyrin, localized in a plasmatic membrane, differs from other intracellular porphyrins (protoporphyrin, coproporphyrin).

Key words: *fluorescence, plasmatic membranes, yeast, porphyrins*