

## ВЛИЯНИЕ ДИПИРИДАМОЛА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ НА ЭНЕРГИЗАЦИЮ МЕМБРАН ХРОМАТОФОРОВ БАКТЕРИЙ *Rhodobacter sphaeroides*

© 2017 г. П.П. Нокс, Е.П. Лукашев, Н.Х. Сейфуллина, В.В. Горохов, А.Б. Рубин

*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,  
119991, Москва, Ленинские горы, 1/12*

*E-mail: gorokhgiceron149@gmail.com*

Поступила в редакцию 16.03.17 г.

Механизмы специфического терапевтического влияния дипиридамола остаются предметом исследований. В настоящей работе были изучены эффекты дипиридамола и ряда его производных на энергизацию фотосинтетических мембран хроматофоров пурпурных бактерий. Показано, что при освещении хроматофоров в присутствии дипиридамола наблюдается появление его радикальной формы, связанной с наличием у него электрон-протондонорных свойств. Именно эти свойства и обуславливают энергизацию функционально активной фотосинтетической мембраны при ее освещении в присутствии дипиридамола и его производных. Наличие таких свойств у дипиридамола, очевидно, надо учитывать при исследовании эффектов данного агента как медицинского препарата специфического действия.

*Ключевые слова: дипиридамол, перенос электрона и протона, супероксид, фотосинтетические мембраны, энергизованное состояние.*

Дипиридамол (2,6-бис(диэтаноламино)-4,8-дипиридинопиримидо(5,4-d)пиримидин) является известным коронарным вазодилататорным средством, тормозящим агрегацию тромбоцитов, ведущую к тромбообразованию. Также дипиридамол служит эффективным ингибитором особого трансмембранного белка «P-gr» – неспецифической АТФ-зависимой «помпы» липофильных соединений, активно выкачивающей из раковой клетки противоопухолевые лекарственные соединения [1–3]. Несмотря на длительное применение дипиридамола в медицинской практике, механизмы его специфического терапевтического влияния все еще остаются предметом исследований.

В наших предыдущих работах мы подробно исследовали влияние дипиридамола и его различных производных на процессы фотоиндуцированного переноса электронов и протонов в бактериальных фотосинтетических реакционных центрах (РЦ) пурпурных бактерий и в пурпурных мембранах галобактерий, содержащих бактериородопсин [4–7]. В этих исследованиях природные фоточувствительные пигмент-белковые комплексы были использованы

в качестве удобных информативных тест-систем для изучения возможных молекулярных механизмов влияния дипиридамола и его производных на мембранные белки. В препаратах изолированных РЦ *Rb. sphaeroides* с заблокированным переносом электронов между первичным ( $Q_A$ ) и вторичным ( $Q_B$ ) хинонными акцепторами при активации их единичными вспышками света в присутствии дипиридамола нами было обнаружено ускорение темновой рекомбинации между фотоокисленным димером бактериохлорофилла (БХл)  $P^+$  и  $Q_A^-$  в четыре–пять раз, которое мы связали с изменениями состояния системы водородных связей в окружении первичного хинона, участвующих в стабилизации электрона на  $Q_A$ . При переходе электрона на  $Q_B$  его обратный перенос к  $P^+$ , который, как известно, у бактерий данного вида идет с участием первичного хинона [8], становился более медленным по сравнению с контролем. На мембранах хроматофоров этих бактерий при активации их последовательными вспышками света было также показано, что хорошо проникающий в гидрофобные области мембраны дипиридамол [9] тормозит образование полностью восстановленного гидрохинона  $Q_BH_2$ , происходящее после второй вспышки света за счет захвата двух протонов из среды – возможно в результате замедления процесса транспорта

Сокращения: РЦ – реакционный центр,  $Q_A$  и  $Q_B$  – первичный и вторичный хинонные акцепторы, БХл – бактериохлорофилл,  $P$  – фотоактивный БХл, ДХФИФ – дихлорофенолиндофенол.

протонов к восстанавливаемому  $Q_B$ . Это явление наблюдалось даже при нормальных значениях рН (около 7,5), что существенно выше значения рК для дипиридамола (5,8 в воде). Однако бактериородопсин в пурпурных мембранах дипиридамола влиял на фотоцикл только в своей полностью протонированной форме (при рН ниже значений рК), замедляя сопряженный с репротонированием основания Шиффа распад М-интермедиата. Было предположено, что в данном случае имеет место электростатическое «торможение» движения  $H^+$  положительно заряженной протонированной формой дипиридамола, находящейся внутри канала. Те производные дипиридамола, которые не обладали способностью проникать в гидрофобную область белка, не влияли на скорость переноса протона ни в мембранах хроматофоров, ни в канале бактериородопсина даже в полностью протонированном виде.

Установлено, однако, что дипиридамола обладает также антиоксидантными свойствами, ингибируя, в частности, перекисное окисление липидов за счет способности к одно- и двух-электронному окислению [9,10]. Согласно работе [11], его среднеточечные потенциалы  $E_m$  составляют соответственно +120 и +400 мВ в ацетонитриле и +470 и +680 мВ в этаноле. Высказываются предположения, что терапевтические эффекты данного химического соединения могли бы быть связаны и с его антиоксидантной способностью [12,13].

В этой связи представляет интерес исследовать, в какой мере антиоксидантные свойства дипиридамола и его производных могут играть роль в рассмотренной выше модуляции специфической фотоактивности мембранных электрон- и протонтранспортных белков. В работе [14] мы действительно показали, что при активации изолированных из мембран препаратов РЦ пурпурных бактерий *Rb. sphaeroides* постоянным светом генерируется катион-радикал дипиридамола, который существенно влияет на кинетику темновой рекомбинации разделенных на свету зарядов между фотоактивным БХл и хинонными акцепторами. Добавление дипиридамола и его производного RA-47 (см. структуру в разделе «Методы») к препаратам изолированных РЦ сопровождалось уже в темноте восстановлением частично окисленного при препаративных процедурах выделения РЦ фотоактивного пигмента Р и к появлению фазы снижения стационарной амплитуды фотоиндуцированных изменений сигнала фотоокисленного Р ( $P^+$ ). Иными словами, данные агенты проявляли электрондонорные свойства, причем в части РЦ это приводило к «перевосстанов-

лению» электрон-транспортной цепи РЦ, т.е. восстановлению  $P^+$  от внешнего донора (дипиридамола) в условиях, когда при освещении постоянным светом восстановлен хинонный акцептор. Такой эффект наблюдается в условиях избытка экзогенного донора электронов, например аскорбата натрия.

Методом ЭПР мы показали, что активация РЦ постоянным действующим светом, инициировавшая электрон-транспортные процессы в РЦ, сопровождается генерацией и гибелью радикалов дипиридамола и RA-47 в препаратах РЦ, содержащих эти агенты [14]. У радикальной формы RA-47 сигнал был заметно сильнее. В образцах с RA-25 его радикальная форма практически не генерировалась. Появляющийся при освещении РЦ сигнал радикальной формы RA-47 и дипиридамола существенно перекрывался с сигналом катион-радикала Р. Соответственно, при регистрации методом ЭПР редокс-превращений Р мы наблюдали суперпозицию сигналов катион-радикала  $P^+$  и радикальной формы модифицирующего агента. При активации постоянным светом РЦ, содержащих дипиридамола или RA-47, появлялся вклад нового сигнала, который характеризовался неразрешаемой прибором быстрой, а затем медленной с секундными временами фазами роста. Это увеличение сигнала на свету затем сменялось его исчезновением. После выключения действующего света в части РЦ с добавленными дипиридамолом или RA-47 полного восстановления фотоокисленного Р не происходило. При этом в образцах, содержащих RA-47, доля РЦ с невосстанавливаемым в темноте  $P^+$ , была выше.

Исследования условий появления и распада радикальной формы модифицирующих агентов при освещении РЦ и степени их влияния на величину невосстанавливаемой в темноте фракции РЦ показали, что эти процессы зависят от эффективности временной стабилизации фотомобилизованного электрона в хинонной акцепторной части РЦ, т.е. от интенсивности и времени светового воздействия. Ранее мы показали также [15], что в ходе активации РЦ постоянным светом в обычных аэробных условиях наблюдается исчезновение анион-семихинона  $Q_B$  (вероятно, в результате ухода электрона вглубь белковой структуры РЦ) и происходит генерация супероксидного радикала. Это свидетельствовало о том, что участие молекулярного кислорода в электрон-транспортных реакциях на акцепторном участке цепи увеличивает временную эффективность стабилизации разделенных в РЦ зарядов. Результаты работы [14] позволили нам предположить, что дипиридамола и его производные помимо непо-

средственного донирования (с различной степенью эффективности) электронов к фотоокисляемому БХл Р могут взаимодействовать и с появляющимся в среде при продолжительной световой активации РЦ супероксидом, обуславливая наблюдаемую в эксперименте медленную фазу роста и гибели сигнала радикальной формы дипиридамола и RA-47. Наличие подвижных атомов водорода в молекулах дипиридамола и RA-47, благодаря которым они способны к формированию межмолекулярных водородных связей, вероятно, позволяет им также взаимодействовать и с супероксид-радикалом кислорода. В этом случае донирование ими протона к супероксиду может приводить к появлению протонированного супероксида  $O_2\cdot H$  [16] с потерей своих электрон-донорных свойств, что объясняет частичную необратимость фотоокисления Р при активации постоянным действующим светом в присутствии дипиридамола и RA-47. Возможностью возникновения  $O_2\cdot H$  объясняются и зависящие от присутствия молекулярного кислорода эффекты окисления хинола (восстановленного гидрохинона,  $QH_2$ ) цитохромом  $bc_1$  в работе [17]. Такая реакция протонирования супероксид-радикала представляется очень вероятной, поскольку еще в нашей ранней работе [15] мы тестировали генерацию супероксида в препаратах РЦ *Rb. sphaeroides* при освещении постоянным светом по появлению ЭПР-сигнала спиновой ловушки тайрона (1,2-диоксибензол-3,5-дисульфоната натрия), который возникает при смещении подвижного протона в его структуре к супероксиду.

Представляло интерес продолжить исследование восстановительных возможностей дипиридамола и его производных на мембранных препаратах *Rb. sphaeroides*. Полное сохранение в них и фотосинтетической электрон-транспортной цепи, и системы энергетического сопряжения позволяет регистрировать в этих мембранных структурах трансформацию поглощенной световой энергии в энергию трансмембранно разделенных зарядов. Перенос электрона по цепи порфириновых кофакторов и хинонных акцепторов  $Q_A$  и  $Q_B$  можно наблюдать в ближней ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной областях спектра по изменению характерных полос поглощения фотоактивного димера БХл, мономерного БХл, бактериофеофитина, семихинон-радикала и полностью восстановленного гидрохинона. Помимо абсорбционных индикаторов электрон-транспортных событий существуют индикаторы локальных и трансмембранных электрических полей. Так, сдвиги полос поглощения каротиноидов возникают в ответ как на локальное разделение зарядов в

РЦ, так и на появление генерализованного трансмембранного поля, индуцирующего поляризацию белкой матрицы [18]. В то же время наблюдающийся в ИК-области спектра при 840–900 нм длинноволновый (так называемый «красный») сдвиг полосы поглощения молекул светособирающего БХл отражает в основном образование энергизованного состояния мембраны хромофора и не чувствителен к отдельным стадиям локального транспорта электрона по цепочке  $P-Q_A-Q_B$ . Эти изменения абсорбции наблюдались в целых клетках различных видов пурпурных бактерий в нормальных физиологических условиях и отсутствовали при низких температурах и добавлении разобщителей фосфорилирования. Они обнаружены и в препаратах, выделенных из клеток бактерий хромофоров, которые имели замкнутую везикулярную (как у бактерий *R. rubrum*, *Rb. sphaeroides*, *Ch. minutissimum*), но не ламинарную (*E. shaposhnikovii*) структуру [19–21]. Этот энергозависимый «красный» сдвиг поглощения БХл наблюдался в условиях, когда трансмембранный перенос электронов сопровождался антибатным транспортом протонов в виде полностью восстановленного вторичного гидрохинона в результате работы так называемого Q-цикла с участием цитохром  $bc_1$ -оксидоредуктазного комплекса. В случае добавления в среду экзогенного донора электронов (2,6-дихлорфеноиндофенола (ДХФИФ) с избытком аскорбата натрия), вызывающего усиление циклического транспорта электронов на стационарном свете, происходила стимуляция этих изменений поглощения. В то же время блокирование электронного транспорта на участке между первичным и вторичным хинонными акцепторами с помощью специфического ингибитора *o*-фенантролина приводило к их полному подавлению [22].

Вся совокупность экспериментальных данных показывала, что фотоиндуцированная генерация красного сдвига полосы поглощения светособирающего БХл в ближней ИК-области является надежным показателем работы системы энергетического сопряжения в хромофорной мембране, а его величина пропорциональна напряжению электрического поля на мембране. Ранее мы уже использовали эту систему для оценки электрон-транспортных и разобщающих возможностей различных *o*-фенантролиновых комплексов кобальта и меди [23] и показали, что первые из них обладают заметной электрон-донорной активностью, стимулирующей энергозависимый красный сдвиг полосы БХл на стационарном свете, а вторые – ингибируют эти изменения поглощения. Поскольку ком-

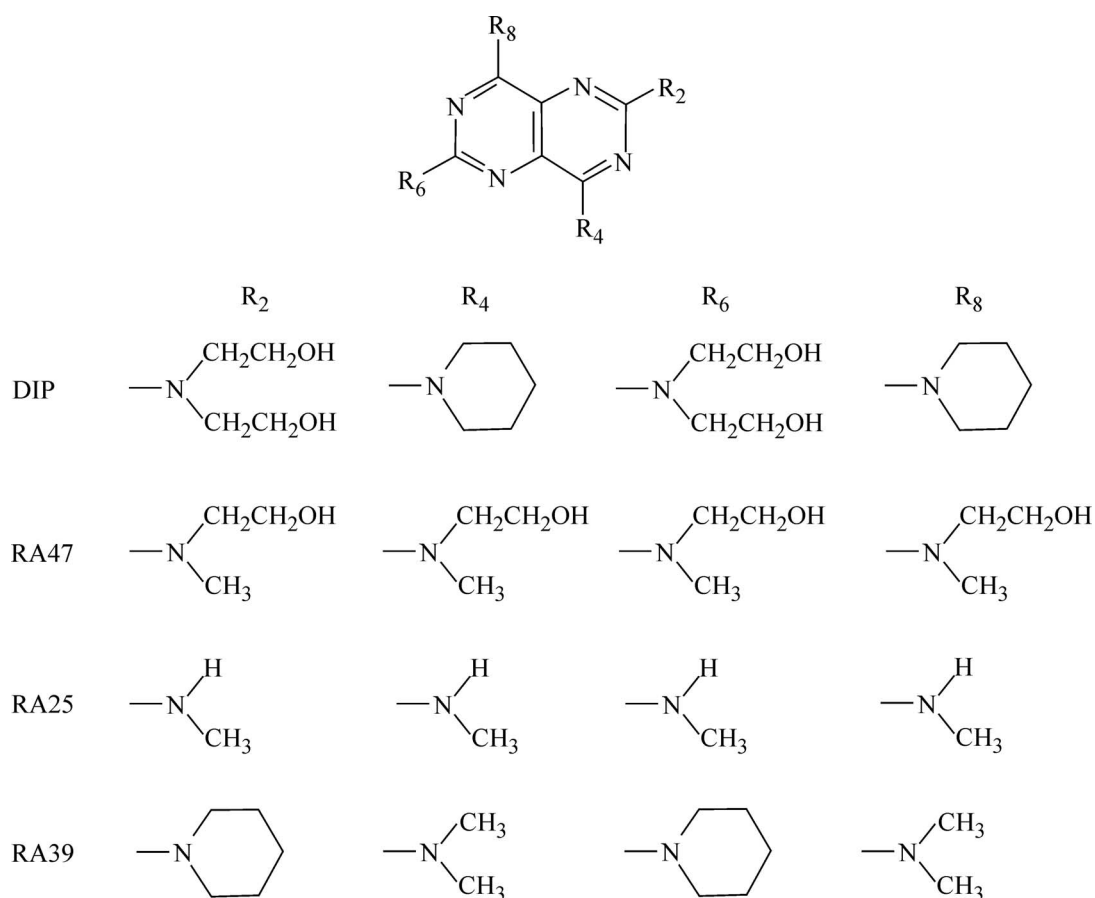


Рис. 1. Структурные формулы дипиридамола и его исследованных производных.

плексы меди никак не влияли на отдельные стадии переноса электрона в препаратах изолированных РЦ, был сделан вывод об образовании ими в хроматофорах мембранной поры, приводящей к диссипации ионного градиента.

В настоящей работе мы исследовали влияние дипиридамола и ряда его производных (см. рис. 1) на функциональную активность мембраносвязанных фотосинтетических белково-пигментных комплексов и на мембранные процессы энергизации нативных хроматофоров пурпурных бактерий *Rb. sphaeroides*.

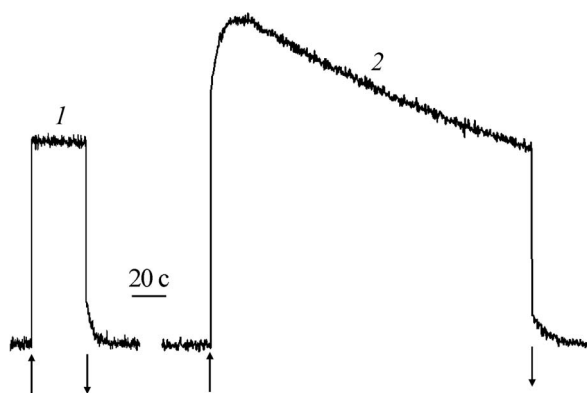
## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фотосинтетические мембраны хроматофоров из пурпурных несерных бактерий *Rhodospira rubra* дикого типа выделяли из предварительно отмытых натрий-фосфатным буфером (100 мМ, рН 7,5) свежих клеток пяти-шестидневной культуры. Был применен стандартный метод фракционного центрифугирования после ультразвуковой дезинтеграции клеток. Неразрушенные клетки и крупные частицы отделяли центрифугированием при 40000 *g* в те-

чение 15 мин, хроматофоры получали центрифугированием надосадочной жидкости при 144000 *g* в течение 120 мин. Хроматофоры суспендировали в натрий-фосфатном буфере (50 мМ, рН 7,5) и хранили в дальнейшем в анаэробных условиях при температуре +6°C. Непосредственно перед опытом хроматофоры разводили буфером до концентрации, отвечающей ~10 мкМ фотоактивного пигмента. Все измерения в дальнейшем проводили в аэробных условиях при комнатной температуре.

Измерение окислительно-восстановительного потенциала среды проводили милливольтметром непосредственно в кювете размерами 2 × 10 × 40 мм с помощью рабочего электрода из платиновой проволоки диаметром 1 мм и Ag/AgCl-электрода сравнения (Microelectrodes, Inc., США). Его величина обычно была около +400 мВ и добавление дипиридамола и его производных не изменяло редокс-свойств.

ЭПР-измерения в области поглощения катион-радикала фотоактивного БХл ( $g = 2,0026$ ,  $\Delta H \cong 0,8$  мТл) проводили на спектрометре трехсантиметрового диапазона РЭ 1307 (ПО Ана-



**Рис. 2.** Регистрируемые методом ЭПР в максимуме второй производной сигнала катион-радикала Р кинетики фотоиндуцированных изменений контрольной суспензии хромотофоров *Rb. sphaeroides* (1) и хромотофоров, содержащих  $10^{-4}$  М дипиридамола (2). Моменты включения и выключения действующего света указаны стрелками соответственно вверх и вниз.

литприбор, Смоленск) при активации образцов постоянным действующим светом. Его интенсивность составляла около  $1 \text{ кДж}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ . Толщина кюветы с образцом равнялась 0,2 мм.

Фотоиндуцированные изменения поглощения в области 740–920 нм регистрировали на сконструированном в нашей лаборатории однолучевом дифференциальном спектрофотометре с механической модуляцией света [24], толщина кюветы составляла 2 мм. В качестве источника действующего света была использована лампа накаливания КГМ-300 с водным тепловым и граничным КС-13 (длина волны пропускания  $> 620$  нм) светофильтрами. Интенсивность света составляла  $160 \text{ Дж}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ . Разностные спектры поглощения типа «свет минус темнота» регистрировали по точкам с шагом в 10 нм. Кинетику фотоиндуцированных изменений поглощения измеряли на самописце с постоянной времени 0,5 с.

Для ингибирования переноса электронов между хинонными акцепторами  $Q_A$  и  $Q_B$  к суспензии хромотофоров добавляли *o*-фенантролин (Sigma, США) в концентрации  $10^{-2}$  М. Все остальные использованные химикаты были квалификации не ниже «ч.д.а.».

Дипиридамола и его производные добавляли к суспензии хромотофоров в виде водного раствора в концентрации  $10^{-2}$  М с рН  $\sim 3,5$ . Кислые значения рН были необходимы для более полной растворимости соединений в воде. Высокая буферная емкость в суспензии хромотофоров обеспечивала заданное значение рН  $\sim 7,5$  даже при максимальных концентрациях в  $10^{-3}$  М, когда исследуемые соединения добавляли как

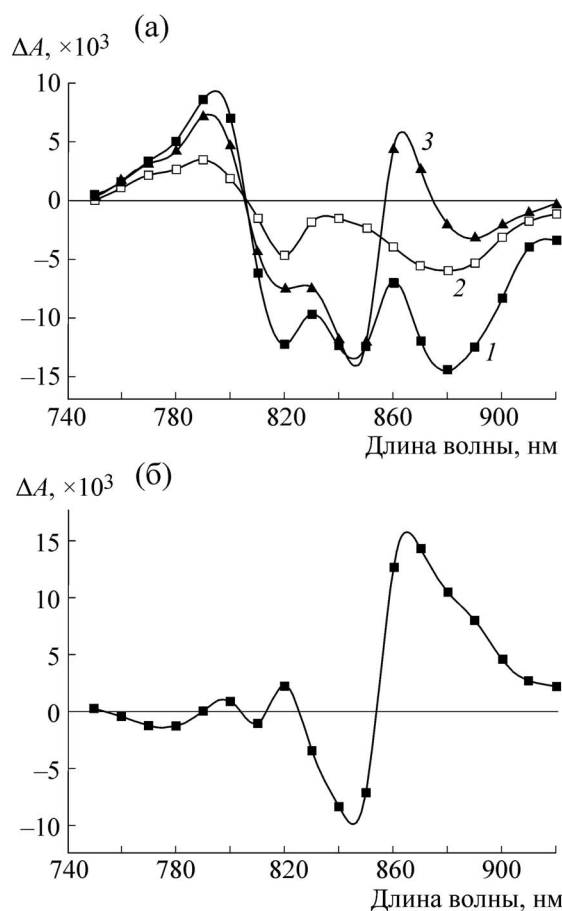
$1/9$  от объема хромотофоров. Время инкубации с реагентом перед измерениями составляло 15 мин.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 приведены индуцируемые постоянным действующим светом сигналы ЭПР, регистрируемые в точке максимума второй производной катион-радикала Р в контрольной суспензии хромотофоров и в хромотофорах, содержащих  $10^{-4}$  М дипиридамола. Видно, что при освещении хромотофоров, содержащих дипиридамола, появляется вклад нового сигнала, который характеризуется неразрешаемой прибором быстрой фазой нарастания и медленной с секундными временами дальнейшей фазой роста. Увеличение амплитуды сигнала на свету затем сменяется ее уменьшением.

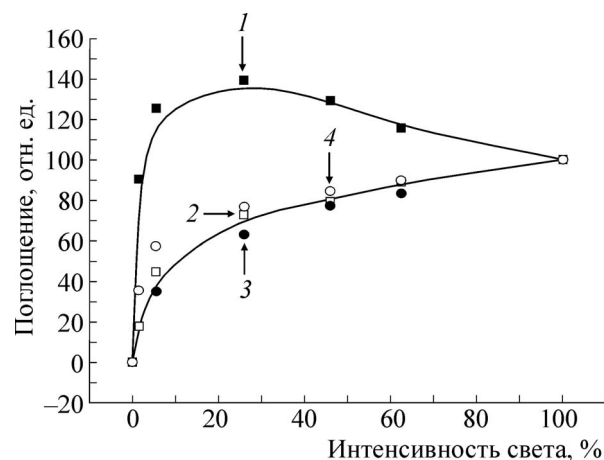
Разностные спектры поглощения «свет–темнота» хромотофоров бактерий *Rb. sphaeroides* в контроле (кривая 1), а также в присутствии ингибитора переноса электронов *o*-фенантролина (кривая 2) и соединения RA-39 (кривая 3) приведены на рис. 3а. Спектр контрольного образца в ближней ИК-области имел положительный максимум при 790 нм и три отрицательных максимума при 820, 840 и 880 нм. Это свидетельствовало о том, что нативность мембран хромотофоров не нарушена и что под влиянием появляющейся на мембране разности потенциалов возникает «красный» сдвиг полосы светособирающего БХл (см. раздел «Введение»). Циклическая активность фотосинтетического аппарата (количество перенесенных электронов за единицу времени световой экспозиции), очевидно, невысокая, поскольку положительных изменений в области 850–900 нм не наблюдалось. При блокировании транспорта электрона между первичным и вторичным хинонными акцепторами *o*-фенантролином сохраняются лишь изменения абсорбции, которые отражают фотоокисление Р, характеризующиеся выцветанием полосы при 870 нм и сопутствующим коротковолновым сдвигом полосы поглощения мономерного БХл при 800 нм, с дифференциальными максимумом при 790 нм и минимумом при 820 нм (кривая 2, рис. 3а).

Добавление RA-39 и других исследованных в настоящей работе производных дипиридамола вызывало стимуляцию энергозависимых абсорбционных изменений. В дифференциальном спектре поглощения в области 850–900 нм наблюдалось появление положительных изменений абсорбции, представляющих собой суперпозицию изменений двух типов: связанных с окислительно-восстановительными переходами



**Рис. 3.** (а) – Разностные спектры поглощения «свет-темнота» хромофоров бактерий *Rb. sphaeroides* в контроле (спектр 1), а также в присутствии ингибитора переноса электронов  $10^{-2}$  М *o*-фенантролина (спектр 2) и  $10^{-3}$  М соединения RA-39 (спектр 3). (б) – Разность между спектром 3 и спектром 2. Спектр 2 нормирован на спектр 3 при 790 нм.

редокс-компонентов РЦ и отражающих действие внешнего трансмембранного поля на молекулы светособирающего БХл. В пользу этого заключения свидетельствует и сложная кинетика фотоиндуцированных изменений поглощения после выключения активирующего света, явно указывающая на существование более медленно релаксирующих «положительных» и более быстрых «отрицательных» абсорбционных изменений. Первые, очевидно, связаны с «красным» сдвигом БХл, а вторые – с окислительно-восстановительными превращениями фотоактивного пигмента Р. Световые кривые, измеренные в спектральной области характерной для абсорбционных изменений только второго типа (например при 790 нм) и в области, где наблюдается суперпозиция изменений обоих типов (около 860 нм), также подтверждают данный вывод (рис. 4). Из рисунка видно, что амплитуда изменений поглощения при 790 нм



**Рис. 4.** Световые кривые, измеренные в спектральной области, характерной для абсорбционных изменений только второго типа (790 нм), и в области, где наблюдается суперпозиция изменений обоих типов (860 нм): при 860 нм в присутствии  $10^{-3}$  М RA-47 (кривая 1), при 860 нм для контрольного образца (с обратным знаком) (кривая 2), при 790 нм в присутствии  $10^{-3}$  М RA-47 (кривая 3), при 790 нм для контрольного образца (кривая 4).

монотонно растет при увеличении интенсивности действующего света, не достигая уровня насыщения даже при максимальных значениях освещенности. В то же время величина изменений поглощения при 860 нм достигает максимума уже при сравнительно низких интенсивностях световой активации, а затем с дальнейшим ростом интенсивности света она монотонно снижается. Очевидно, что те положительные фотоиндуцированные изменения поглощения, которые связаны с длинноволновым сдвигом полосы БХл под действием разделенных на мембране зарядов, имеют существенно более низкую область светового насыщения, чем отрицательные изменения поглощения, обусловленные выцветанием фотоактивного димера Р. Иными словами, величина трансмембранного потенциала достигает максимального уровня уже при умеренных световых потоках, когда работа Q-цикла по переносу липофильного вторичного восстановленного гидрохинона через мембрану не является лимитирующей стадией в генерации разности потенциалов. Дальнейшее увеличение частоты попадания квантов света в РЦ приводит к окислению большего числа молекул Р (см. кривые 2 и 3 на рис. 4), и, по-видимому, к образованию большего числа восстановленных молекул в пуле хинонов, но лимит по возможности их переноса через толщу мембраны уже не приводит к росту мембранного потенциала. Напомним, что напряженность поля при этом может достигать величины порядка  $10^8$  В/м [25].

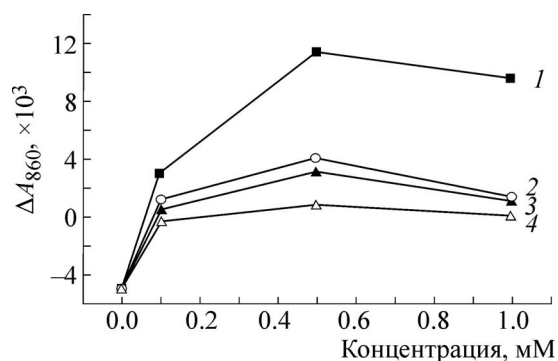


Рис. 5. Величина изменений поглощения хроматофоров *Rb. sphaeroides* при 860 нм, содержащих RA-47 (1), RA-39 (2), дипиридамол (3), RA-25 (4).

Вычитая из дифференциального спектра, полученного в экспериментальных условиях работы циклического транспорта электронов с генерацией трансмембранного электрического поля, спектра, который отражает чисто окислительно-восстановительные процессы в порфириновых кофакторах РЦ (последние можно регистрировать в присутствии разобщителей фосфорилирования, при низких температурах, при ингибировании транспорта электронов в пул вторичных хинонов *o*-фенантролином, а также в хроматофорах с поврежденной мембранной структурой), можно получить разностные спектры для потенциал-зависимых изменений абсорбции. Мы провели вычитание из спектра 3 (в условиях стимуляции «красного» сдвига соединением RA-39) спектра 2 (в присутствии  $10^{-2}$  М *o*-фенантролина) после его нормировки при 790 нм. Результаты показаны на рис 3б. Структура разностного спектра свидетельствует о том, что в условиях энергизации мембран хроматофоров происходит длинноволновый сдвиг полосы поглощения светособирающей антенны молекул БХл при 850 нм.

Известно, что у бактерий *Rb. sphaeroides* существуют два пигмент-белковых антенных комплекса – комплекс молекул с максимумами поглощения при 800 и 850 нм (БХл 800–850) и комплекс с максимумом поглощения при 870 нм (БХл 870). Согласно данным рентгеноструктурного анализа [26,27], комплекс БХл 800–850 является в мембранах хроматофоров внешней антенной для фотоактивного димера Р и состоит из двух окружающих РЦ цилиндров по девять трансмембранных белковых спиралей (радиусом 1,8 нм и 3,4 нм), между которыми локализованы 18 молекул БХл 850. Эти молекулы БХл находятся в существенно гидрофобном окружении, тесно упакованы и ориентированы плоскостями своих порфириновых ко-

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

В качестве показателя эффективности влияния исследуемых агентов на энергизацию фотосинтетических мембран мы использовали величину изменений поглощения в максимуме изменений при 860 нм (рис. 5). По этому показателю наиболее эффективным оказался RA-47, а далее по мере убывания активности препараты стоят в ряду: RA-39 – дипиридамол – RA-25.

Мы упоминали выше, что, изучая действие производных дипиридамола на характер темновой рекомбинации фотоокисленного Р и восстановленного  $Q_A$  при световой активации изолированных РЦ этих бактерий, мы показали, что все эти соединения вызывают ускорение процесса восстановления  $P^+$  [4,5]. Если в контроле характерное время процесса составляет около 85 мс, то в присутствии RA-47 появляется компонент с  $\tau$  около 10 мс, в присутствии дипиридамола – около 20 мс, а RA-25 – около 60 мс. Существует явная корреляция между способностью соединений ускорять восстановление  $P^+$  в темноте и амплитудой изменений поглощения при 860 нм, пропорциональных трансмембранному полю.

Обнаруженный эффект дипиридамола и его производных на хроматофоры можно объяснить, полагая, что данные агенты обладают электрон-донорными свойствами, т.е. отдают электрон фотоокисленной молекуле  $P^+$ , как это делают, например, редокс-медиаторы ДХФИФ или тетраметилфенилендиамин в присутствии аскорбата натрия. Их стимулирующее действие на процесс энергизации мембран хроматофоров хорошо известно [21] и заключается в усилении циклического транспорта электронов за счет их притока от восстановленной формы красителя на фотоокисленный пигмент  $P^+$ . Регистрируемая при этом скорость темнового восстановления  $P^+$  становится выше как в хроматофорах после освещения постоянным светом, так

и в препаратах изолированных РЦ после однократной короткой вспышки.

На рис. 6 показаны кинетические кривые фотоиндуцированных изменений поглощения в хромофорах при 790 нм (в полосе-индикаторе окислительно-восстановительных превращений) в контроле и при добавлении ДХФИФ-Н<sub>2</sub> или RA-39. Из рисунка видно, что темновое восстановление пигмента существенно ускоряется в обоих случаях, что является аргументом в пользу предположения об электрон-донорных свойствах производных дипиридамола. Причем если такие редокс-медиаторы, как ДХФИФ или тетраметилфенилендиамин, являются донорами электронов только в протонированной форме, то дипиридамол и его производные, очевидно, активны и в депротонированном виде, поскольку все измерения были проведены при рН 7,5, заметно превосходящем значения их рК (лежащие в диапазоне 4,0–5,0). Необходимо также отметить, что механизм окисления дипиридамола до сих пор является предметом исследований. Точный сайт протонирования молекулы дипиридамола неизвестен, а стехиометрия анодного окисления дипиридамола в водном растворе отвечает отрыву двух электронов от каждой молекулы дипиридамола, сопровождаемом освобождением одного протона на окисляемую молекулу [28].

Донирование электронов дипиридамолом или его производными в электрон-транспортную цепь кофакторов РЦ, чему, по-видимому, отвечает быстрая фаза роста сигнала радикала на рис. 2, сопровождается образованием восстановленного гидрохинона (хинола) Q<sub>B</sub>-H<sub>2</sub>. Последний уходит в мембрану, быстро замещаясь невосстановленным убихиноном-10 из мембранного пула, размер которого составляет 20–30 молекул убихинона на один РЦ [29,30].

Мембранный комплекс цитохрома bc<sub>1</sub> при окислении убихинола в присутствии молекулярного кислорода продуцирует появление аниона супероксида [16]. Действительно, сопутствующее такой реакции поглощение молекулярного кислорода энергопреобразующими мембранами хромофоров пурпурных бактерий в условиях циклического транспорта электрона было показано уже давно [31]. В свою очередь, появляющийся в мембране супероксид может вступить в реакцию с дипиридамолом и его производными. Возможность такой реакции была продемонстрирована нами на препаратах изолированных РЦ, способных генерировать супероксидный радикал при освещении постоянным светом, чему отвечала медленная фаза роста и гибели сигнала дипиридамола [14]. Как показывают расчеты, для тушения дипирида-

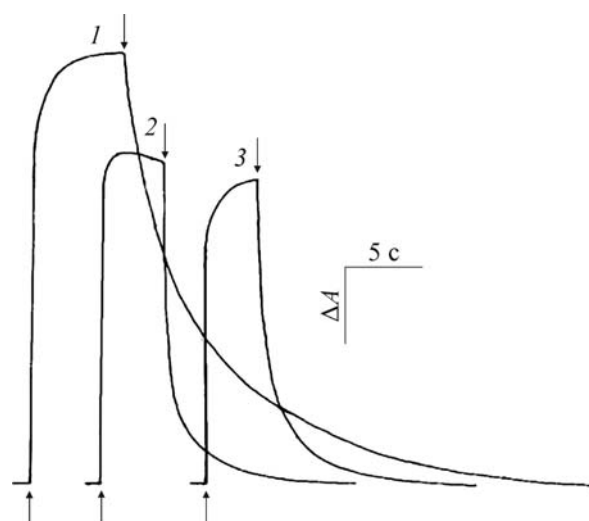


Рис. 6. Кинетические кривые фотоиндуцированных изменений поглощения в хромофорах *Rb. sphaeroides* при 790 нм в контроле (1) и при добавлении 10<sup>-3</sup> М ДХФИФ-Н<sub>2</sub> (2) или 10<sup>-4</sup> М RA-39 (3).

молом свободных радикалов энергетически выгодным является сопряженный с отрывом электрона перенос протона от различных атомов азота [13].

Согласно современным представлениям [32], в ходе полного реакционного цикла, осуществляемого bc<sub>1</sub>-комплексом, две молекулы хинола окисляются до двух молекул хинона в так называемом Q<sub>o</sub>-сайте комплекса на стороне мембраны, противоположной локализации хинонного акцепторного участка РЦ. Далее два электрона из четырех из Q<sub>o</sub>-сайта могут восстанавливать подвижный переносчик электронов для фотоокисленного комплекса P<sup>+</sup>-цитохром c, а другие два электрона восстанавливают одну молекулу хинона из мембранного пула до хинола в Q<sub>i</sub>-сайте комплекса на другой стороне мембраны. Последнее сопровождается дополнительно поглощением двух протонов из среды. Как показывают оценки, выполненные в работе [32], при наличии молекулярного кислорода он легко диффундирует внутрь bc<sub>1</sub>-комплекса, где в Q<sub>o</sub>-сайте в побочной реакции он может восстанавливаться до супероксида. Также, согласно работе [16], сам молекулярный кислород может принимать атом водорода от молекулы хинола, продуцируя протонированный супероксид (O<sub>2</sub>-H), который, диффундируя далее в водную фазу, генерирует при депротонировании супероксид.

В нашем случае перенос электронов на кислород, сопровождаемый протонированием появляющегося супероксида молекулами дипиридамола и его производными, возможно, явля-



ется одним из источников наблюдаемой при освещении препаратов хроматофоров постоянным светом энергизации фотосинтетической мембраны в результате поглощения и трансмембранного перемещения протонов функционирующим  $bc_1$ -комплексом. Вероятно также, что электрондонорная способность дипиридамола и его производных приводит к активации индуцируемого светом циклического транспорта с участием водорастворимых подвижных молекул цитохрома *c*. Последние частично теряются при ультразвуковой обработке бактериальных клеток в ходе препаративной процедуры выделения хроматофоров в результате механического воздействия [33]. Поэтому в исходных препаратах хроматофоров циклическая активность невысока (рис. 3, кривая 1).

Таким образом, как видно, дипиридамола при взаимодействии с функциональными биологическими мембранами, обладающими электрон-протонтранспортной активностью, может проявлять электрон-протондонорные свойства, что необходимо, очевидно, учитывать при исследовании эффектов данного агента как медицинского препарата специфического действия.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. Marchandt, A. D. Prichard, P. Casanegra, and L. Lindsay, *Am. J. Cardiol.* **53**, 718 (1984).
2. L. Iuliano, A. R. Colavita, R. Leo, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **22**, 999 (1997).
3. D. R. Shalinsky, M. Andreef, and S. B. Howell, *Cancer Res.* **50**, 7537 (1990).
4. P. P. Knox, I. Yu. Churbanova, E. P. Lukashov, et al., *J. Photochem. Photobiol.* **56**, 68 (2000).
5. Н. И. Захарова, Е. П. Лукашев, П. П. Нокс и др., *Биофизика* **45**, 648 (2000).
6. П. П. Нокс, Е. П. Лукашев, М. Д. Мамедов и др., *Биохимия* **65**, 256 (2000).
7. P. P. Knox, E. P. Lukashov, M. D. Mamedov, et al., *Progr. in Reaction Kinetics and Mechanism* **26**, 287 (2001).
8. M. Y. Okamura, M. L. Paddock, M. S. Graige, and G. Feher, *Biochim. Biophys. Acta* **1458**, 148 (2000).
9. M. F. Nepomuceno, A. Alonso, L. Pereira-Da-Silva, and M. Tabak, *Free Radic. Biol. Med.* **23**, 1046 (1997).
10. L. Iuliano, D. Pratico, A. Ghiselli, et al., *Lipids* **27**, 349 (1992).
11. L. E. Almeida, M. Castilho, L. H. Mazo, and M. Tabak, *Anal. Chim. Acta* **375**, 223 (1998).
12. L. Lulianoa, D. Pratico, A. Ghisell, et al., *Lipids* **27**, 349 (1992).
13. A. Barzegar, *PLoS One* **7**, e39660 (2012).
14. П. П. Нокс, К. Н. Тимофеев, В. В. Горохов и др., *Докл. РАН* **473**, 123 (2017).
15. П. П. Нокс, Е. П. Лукашев, К. Н. Тимофеев и Н. Х. Сейфуллина, *Биохимия* **67**, 1085 (2002).
16. Y. Yin, S. Yang, L. Yu, and Ch.-An Yu, *J. Biol. Chem.* **285**, 17038 (2010).
17. F. Zhou, Y. Yin, T. Su, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1817**, 2103 (2012).
18. P. O. Andersson, T. Gillbro, L. Ferguson, and R. J. Cogdell, in: *Current Research in Photosynthesis*, Ed. by M. Baltscheffsky, (Kluwer Academic Publishers, 1990), vol. II, pp. 117–120.
19. V. J. Vredenberg and J. Ames, *Biochim. Biophys. Acta* **126**, 244 (1966).
20. E. L. Barsky and V. D. Samuilov, *Biochim. Biophys. Acta* **325**, 454 (1973).
21. E. L. Barsky and V. D. Samuilov, *Biochim. Biophys. Acta* **548**, 448 (1979).
22. A. A. Kononenko, P. S. Venediktov, S. K. Chemeris, et al., *Photosynthetica* **8**, 176 (1974).
23. Е. П. Лукашев, А. А. Кононенко, Н. И. Захарова и др., *Биохимия* **45**, 273 (1980).
24. *Современные методы исследования фотобиологических процессов*, под ред. А. Б. Рубина (Изд-во МГУ, Москва, 1974).
25. W. Junge, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **28**, 503 (1977).
26. G. McDermott, S. M. Prince, A. A. Freer, et al., *Nature* **374**, 517 (1995).
27. A. W. Roszak, T. D. Howard, J. Southall, et al., *Science* **302**, 1969 (2003).
28. M. Castilho, L. E. Almeida, M. Tabak, and L. H. Mazo, *J. Braz. Chem. Soc.* **11**, 148 (2000).
29. A. R. Crofts and C.A. Wraight, *Biochim. Biophys. Acta* **726**, 149 (1983).
30. A. Mezzettia, W. Leibla, J. Breton, and E. Nbedryk, *FEBS Lett.* **537**, 161 (2003).
31. В. Г. Ременников и В. Д. Самуилов, *Докл. АН СССР* **252**, 491 (1980).
32. P. Husen and I. A. Solov'yov, *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 12150 (2016).
33. P. A. M. Michels and W. N. Konings, *Biochim. Biophys. Acta* **507**, 353 (1978).

## **Influence of Dipyridamole and Its Derivatives on Chromatophore Membranes Energization State of Bacterium *Rhodobacter sphaeroides***

**P.P. Knox, E.P. Lukashov, N.Kh. Seyfullina, V.V. Gorokhov, and A.B. Rubin**

*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskye Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia*

Mechanisms of specific influence of dipyridamole therapy remain subject to further research. In the present work the effects of dipyridamole and some its derivatives on energization state of photosynthetic membranes of purple bacteria chromatophores have been studied. It is shown that at illumination of chromatophores in the presence of dipyridamole the occurrence of its radical form due to the presence of electron-proton donation properties is observed. It is these properties that are key to trigger energization of functionally active photosynthetic membrane when it is illuminated in the presence of dipyridamole and its derivatives. It is obvious that these properties of dipyridamole should be taken into account while studying the effects of this agent as medical preparation of specific action.

*Keywords: dipyridamole, electron and proton transfer, superoxide, photosynthetic membranes, energization state*