

*На правах рукописи*



**Ланкин Антон Вадимович**

**Механизмы токсического действия полициклических ароматических  
углеводородов на фотосинтетический аппарат**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Москва, 2016

Работа выполнена в лаборатории управляемого фотобиосинтеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, и группе экологии и физиологии фототрофных организмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института фундаментальных проблем биологии Российской академии наук

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор **Аллахвердиев Сулейман Ифхан-оглы**

**Научный консультант:**

доктор биологических наук **Креславский Владимир Данилович**

**Официальные оппоненты:**

**Гаевский Николай Александрович**

доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Сибирский федеральный университет, профессор кафедры водных и наземных экосистем

**Иванищев Виктор Васильевич**

доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого, факультет естественных наук, кафедра биологии и технологии живых систем, заведующий кафедрой

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского", г. Нижний Новгород

Защита состоится «22» ноября 2016 г. в 11 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, г. Москва, Ботаническая ул., 35. Факс: (499)977-80-18; e-mail: [ifr@ippras.ru](mailto:ifr@ippras.ru); [m-azarkovich@ippras.ru](mailto:m-azarkovich@ippras.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук [www.ippras.ru](http://www.ippras.ru)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 года.

Учёный секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Азаркович Марина Ивановна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) являются распространёнными в окружающей среде загрязнителями, источником которых может быть как антропогенная активность, так и природные явления. При этом ключевым техногенным источником ПАУ в окружающей среде является термическое разложение органических веществ при недостатке кислорода в результате неполного сжигания различных материалов, прежде всего, древесины и топлива (Huang et al., 1993). Другим источником ПАУ в окружающей среде являются разливы нефти. Так, на основе полученных экспериментальных данных в работе (Baek et al., 2004) сделан вывод, что за негативное влияние нефти в почве на рост растений в основном ответственны содержащиеся в ней ПАУ, такие как нафталин и фенантрен.

Растения являются господствующими составляющими наземных экосистем и способны поглощать ПАУ из природной среды в больших количествах (Simonich, Hites, 1994). С одной стороны, этим они очищают биосферу от данных поллютантов, с другой же – сами подвергаются стрессовому воздействию ПАУ.

ПАУ, являясь липофильными соединениями, хорошо поглощаются липидной фазой биологических мембран, и, таким образом, воздействуют на них. Одной из наиболее уязвимых систем клетки при действии различных повреждающих факторов является фотосинтетический аппарат (ФА). Ключевые компоненты фотосистем функционируют внутри тилакоидных мембран, поэтому, нарушение структуры и изменение состояния мембран при действии ПАУ может влиять на эффективность работы ФА.

Среди фотосинтетических компонентов наиболее уязвимыми к действию стрессовых факторов различной природы, в том числе ПАУ, являются фотосистема 2 (ФС2) и система ассимиляции CO<sub>2</sub> (Berry, Björkman, 1980; Креславский и др., 2007; Tomar, Jajoo, 2014). ПАУ преимущественно накапливаются в липидном бислое мембран, в частности, в мембранах тилакоидов, негативно влияя, таким образом, на фотохимические процессы (Duxbury et al., 1997; Huang et al., 1997). Также ПАУ могут индуцировать образование активных форм кислорода (АФК), в результате чего снижаются фотосинтетическая активность и нарушается структура тилакоидных мембран (Liu et al. 2009).

Некоторые ПАУ имеют относительно неплохую растворимость в воде. К ним относятся, прежде всего, нафталин (Наф), фенантрен (Фен) и флуорантен (Флу). Такие вещества могут быстрее, чем другие, накапливаться в тканях растений, попадая в них не только из воздуха, но и из почвы. Несмотря на актуальность проблемы,

связанной с исследованием влияния ПАУ на ФА растений, в литературе имеется мало сведений о путях и мишенях их действия на ФА и связи ингибирования активности ФА с действием АФК, образующихся при проникновении ПАУ в листья.

Учитывая все большее распространение и накопление полиароматических углеводов в окружающей среде, исследование их влияния на ФА растений представляет не только теоретический, но и практический интерес.

**Цель и задачи исследования.** Целью работы являлось изучение механизмов токсического действия наиболее распространённых ПАУ (нафталин, фенантрен, флуорантен) на ФА в листьях и препаратах тилакоидных мембран. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Получить данные сравнительного исследования влияния вышеупомянутых ПАУ на фотохимическую активность донорной и акцепторной сторон фотосистемы 2 в листьях гороха и препаратах тилакоидных мембран, а также на содержание фотосинтетических пигментов.

2. Исследовать влияние вышеперечисленных ПАУ на структуру хлоропластов и накопление активных форм кислорода в листьях растений.

3. Изучить скорость накопления ПАУ при кратковременной инкубации листьев (1 – 48 ч) в присутствии ПАУ.

4. Исследовать возможность использования различных флуоресцентных параметров, характеризующих фотохимическую активность ФС2 растений, для оценки токсических эффектов полиароматических углеводов.

**Научная новизна.** Обнаружено, что при действии Наф и Фен квантовые выходы переноса электрона от первичного стабильного акцептора электрона  $Q_A$  к вторичному акцептору электрона  $Q_B$  ( $ФЕ_{T_0}$ ), а также вплоть до конечных акцепторов электрона фотосистемы 1 (ФС1) ( $ФРЕ_0$ ), снижаются. Эти результаты объясняются увеличением количества  $Q_B$ -невосстанавливающих центров ФС2, а также увеличением потерь поглощенной энергии в результате тепловой диссипации. Показано, что выявленные эффекты исследованных ПАУ возрастают при увеличении их концентрации и времени экспозиции.

В результате сравнения эффективности ингибирующего действия трёх использованных нами ПАУ (нафталин, фенантрен и флуорантен) на фотохимическую активность ФС2 показано, что кратковременные эффекты действия ПАУ в основном определяются их водной растворимостью.

Показано, что Наф действует в основном на акцепторную сторону ФС2 и в меньшей степени на донорную сторону этой фотосистемы.

Обнаружено, что количество фотохимически активных РЦ фотосистемы 2, размер пула пластохинонов, величина диссипации поглощённой энергии света в

тепло в расчёте на реакционный центр ФС2 и нефотохимическое тушение флуоресценции наиболее чувствительны к действию ПАУ.

При повышенном содержании Наф ( $100 \text{ мг л}^{-1}$ ) обнаружено двухступенчатое по времени увеличение содержания  $\text{H}_2\text{O}_2$  в листьях гороха, что может быть связано первоначально с нарушениями липидного бислоя мембраны плазмалеммы, а затем с нарушением липидного бислоя мембран клеточных органелл.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Вызванное действием ПАУ снижение квантовых выходов переноса электрона от  $Q_A$  к  $Q_B$  ( $\phi_{\text{ET0}}$ ), а также вплоть до акцепторов электрона ФС1 ( $\phi_{\text{RE0}}$ ), и повышение скорости диссипации поглощённой энергии в тепло ( $DI_0/RC$ ) объясняются увеличением количества неактивных реакционных центров ФС2 и нарушениями в ССК ФС2.

2. Количество активных РЦ фотосистемы 2, квантовый выход переноса электронов от  $Q_A$  вплоть до конечных акцепторов электрона ФС1, величина диссипации световой энергии в тепло в расчёте на РЦ ФС2 и нефотохимическое тушение наиболее чувствительны к действию ПАУ.

3. Наф нарушает интактность клеточных мембран, стимулирует образование АФК и действует, в основном, на акцепторную и, в меньшей степени, на донорную сторону ФС2.

4. Кратковременные эффекты ПАУ в основном определяются их водной растворимостью.

#### **Степень достоверности работы.**

При выполнении работы использовались современные, проверенные во многих работах биофизические, биохимические и физиологические методы. Эксперименты проводились в достаточной биологической повторности. Выводы обоснованы экспериментальными данными и отражены в печатных работах. Достоверность полученных результатов обеспечена использованием в работе комплекса методических подходов: современных высокоинформативных биофизических, биохимических и цитологических методов исследования, тщательным учётом и подробной оценкой результатов с использованием адекватных методов статистической обработки данных.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Результаты проведённых исследований вносят вклад в понимание механизмов действия полиароматических углеводородов на ФА и растения в целом. Нами обнаружено, что максимальный квантовый выход электронного транспорта до конечных акцепторов электрона фотосистемы 1 ( $F_v/F_m$ ), скорость тепловой диссипации поглощённой энергии

( $DI_0/RC$ ), площадь над кривой, характеризующая размер пула пластохинона и нефотохимическое тушение (NPQ) флуоресценции наиболее чувствительны к действию нафталина. Измерение этих величин при действии ПАУ может быть использовано как биотест для оценки токсического действия ПАУ.

Материалы диссертации могут быть использованы при чтении лекций по физиологии растений для студентов биологических факультетов вузов.

**Апробация результатов.** Результаты диссертационной работы были доложены на 5 конференциях, включая 17-ую и 18-ую международные Пуцинские школы-конференции молодых учёных (Пушино, 2013 и 2014), научную конференцию «Физиология растений и микроорганизмов – взгляд в будущее» (Томск, 2013), X Международный симпозиум «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования» (Пушино, 2013), а также выступления с докладами в Институтах ИФПБ РАН (Пушино, 2015) и ИФР РАН (Москва, 2015).

**Публикации:** По материалам диссертации опубликовано 7 работ, в том числе две работы в журналах рекомендованных ВАК РФ.

**Структура и объём работы:** Диссертация состоит из введения, пяти глав, выводов, списка литературы. Она изложена на 102 страницах машинописного текста, включает 7 таблиц и 23 рисунка. Список литературы содержит 119 источников, из них 20 на русском языке.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ПАУ относятся к наиболее распространённым органическим поллютантам и являются одним из существенных абиотических стрессовых факторов химической природы. В главе рассматриваются физические и химические свойства ПАУ, их образование и накопление в растениях, а также токсические эффекты распространённых в природе ПАУ (Simonich, Hites, 1994; Manoli, Samara, 1999; Ahammed et al., 2012).

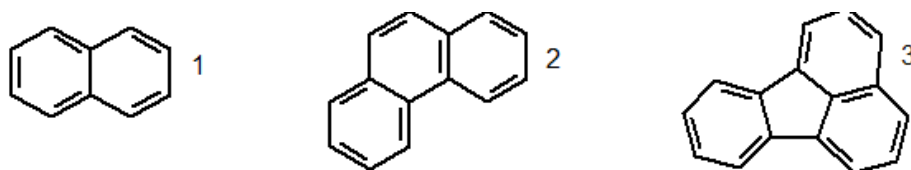
При этом фотосинтетический аппарат (ФА), прежде всего, ФС2, является одной из наиболее уязвимых к действию ПАУ клеточных систем. В главе рассмотрены общие экологические аспекты действия ПАУ на фотосинтезирующие организмы и их ФА. Подробно проанализированы работы, в которых рассмотрено влияние ПАУ на функционирование фотосинтетического аппарата высших растений. При этом основное внимание уделено работам, где изучено влияние ПАУ на первичные процессы фотосинтеза, процессы поглощения световой энергии антенным

комплексом ФС2, передачи энергии в РЦ фотосистемы 2 и последующего переноса электронов в ЭТЦ фотосинтеза, вплоть до конечных акцепторов ФС1.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследования служил горох посевной (*Pisum sativum* L. сорта Московский); его целые отделённые листья и препараты тилакоидных мембран, выделенные из этих листьев. Семена гороха предварительно замачивали на 2 суток, затем выращивали на  $\frac{1}{4}$  среды Кнопа в пластиковых горшках, наполненных песком, в течение 18 сут при интенсивности освещения  $360 \text{ мкмоль квантов м}^{-2}\text{с}^{-1}$  при температуре  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  днем и  $19 \pm 1^\circ\text{C}$  ночью при световом режиме 12/12 часов. Для измерений использовали отделённые листья 3-его и 4-ого яруса. Их помещали в растворы ПАУ (5-6 листьев в сосуды объёмом 100 мл, наполненных 80 мл раствора соответствующего ПАУ) и выдерживали на свету белых люминесцентных ламп интенсивностью 15 и  $120 \text{ мкмоль квантов м}^{-2}\text{с}^{-1}$ .

ПАУ, использованные в экспериментах, принадлежат к числу наиболее распространённых. Наф, Фен и Флу имеют, соответственно, 2, 3 и 4 конденсированных кольца (Рис. 1) и отличаются относительно неплохой водной растворимостью: Наф 27 мг/л, Фен 1,2 мг/л, Флу 0,24 мг/л при  $25^\circ\text{C}$ , соответственно (Perlman et al., 1984).



**Рис. 1.** Структурные формулы нафталина, (1), фенантрена (2) и флуорантена (3).

ПАУ сначала растворяли в небольшом объёме ацетона. Водные образцы ПАУ для экспериментов были приготовлены с использованием исходных ацетоновых растворов с концентрациями 1, 4, 8, 30 и 100 мг/л для Наф и 1, 5, 50 мг/л для Фен и Флу. В большинстве случаев добавляли 0,1 мл исходного раствора к 100 мл бидистиллированной воды. В некоторых опытах использовали перенасыщенные растворы ПАУ, где поллютант присутствовал в образце в виде суспензии.

При исследовании действия ПАУ были использованы электронная микроскопия и флуоресценция хлорофилла *a*, включая “переменную” быструю (БФл) (ОЛР-переходы, ОЛР-transient) и замедленную флуоресценцию (ЗФл) Хл *a* (Bigler, Schreiber, 1990 Stirbet, Govindjee, 2011; Kalaji et al., 2012; Гольцев и др., 2014).

Содержание  $\text{H}_2\text{O}_2$  в листьях определяли в 100 мкл экстракта методом биолюминесценции в системе пероксидаза ( $10^{-6} \text{ M}$ ): люминол ( $10^{-4} \text{ M}$ ) (1:1, объем 1 мл) (Cormier, Prichard 1968).

Проницаемость клеточных мембран оценивали по скорости выхода электролитов из отделённых листьев в водный раствор ПАУ, куда они были помещены, измеряя величину электропроводности раствора с помощью кондуктометра COM-100 (HM Digital, Inc., USA).

Содержание фотосинтетических пигментов (Хл *a*, *b* и каротиноиды) определяли в этанольных экстрактах, используя известные коэффициенты поглощения для соответствующих длин волн (Lichtenthaler, Wellburn, 1987). Концентрацию пигментов определяли с помощью спектрофотометра Spectronic Genesys 10UV, США.

Условия, при которых проводили измерения, и схема работы установки для измерения быстрой флуоресценции описаны в статье Ланкин и др. (2014). Оцифрованные данные о регистрируемой кинетике флуоресценции Хл *a* автоматически передавались на компьютер и на их основе рассчитывали величины различных флуоресцентных параметров:  $E_{T0}/RC$ ,  $E_{T0}/ABS$ ,  $TR_0/RC$ ,  $TR_0/ABS$ ,  $RE_0/ABS$ ,  $ABS/RC$ ,  $RC/CS$ ,  $ABS/CS$ ,  $DI_0/RC$ ,  $F_v/F_0$ ,  $E_{T0}$ ,  $RE_0$ , подробно описанных в ряде статей (Stirbet, Govindjee, 2011; Kalaji et al., 2012, 2014), которые характеризуют различные стороны первичных фотохимических реакций: эффективность фотохимических процессов на различных стадиях, эффективность диссипации световой энергии в тепло и т. д.

С помощью РАМ-флуориметра (ХЕ-РАМ, Heinz-Walz, FRG) были определены величины максимального квантового фотохимического выхода  $\Phi_{C2}$  ( $F_v/F_m$ ), эффективного квантового выхода  $Y(II)$ , скорости электронного транспорта ( $ETR$ ), нефотохимического тушения ( $NPQ$ ) и ряд других параметров.

На основе кинетик ЗФл были оценены величины светоиндуцируемого образования трансмембранного градиента протонов ( $\Delta pH$ ) на тилакоидной мембране и эффективность переноса электрона на акцепторной стороне  $\Phi_{C2}$ .

В таблицах и графиках приведены средние арифметические значения из полученных величин и их стандартные ошибки ( $\pm SE$ ). Использовали не менее трёх биологических и не менее 4-6 аналитических повторностей. Достоверность различий между вариантами описывали по *t*-критерию Стьюдента при 5% уровне значимости.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Растения играют важную роль в удалении ПАУ из атмосферы и почвы, но информации о физиологии и биохимии стрессового ответа, индуцированного ПАУ, недостаточно, в частности, об отношениях между степенью ингибирования первичных процессов фотосинтеза при действии ПАУ, изменением ультраструктуры хлоропластов и других клеточных органелл, и балансом про- и антиоксидантов в клетках листьев растений. В большинстве случаев эффекты ПАУ были изучены при долговременном их действии на ФА растений (Kummerová et al., 2006, 2008; Babula et



al., 2012; Tomar, Jajoo, 2013; Jajoo et al., 2014). Информация о кратковременных эффектах ПАУ на ФА представлена недостаточно (Kummerová, Vánová, 2007; Aksmann, Tukaj, 2008).

Для более полного выявления ключевых мишеней при действии ПАУ на ФА растений проводились кратковременные эксперименты, в которых эффекты использованных ПАУ изучались комплексно в плане сравнения их действия на активность ФА, прежде всего ФС2 (Kreslavski et al., 2014), из компонентов ФА наиболее уязвимую к действию стрессовых факторов (Allakverdiev et al., 2008).

Ранее было показано, что флуоресценция Хл *a* может быть использована для индикации ингибирования переноса электронов в фотосинтетической электрон-транспортной цепи растений, подвергнутых воздействию ПАУ и фотомодифицированных ПАУ (Marwood et al., 2001; Tomar, Jajoo, 2013), в частности величины квантовых фотохимических выходов флуоресценции Хл *a* (Табл. 1).

**Таблица 1.** Влияние Наф и аскорбата натрия (АсК) на флуоресцентные параметры ( $F_0$ ,  $F_m$  и  $F_v/F_m$ ) и содержание фотосинтетических пигментов (Хл (*a+v*) (Хл) и каротиноиды (Кар)). Листья выдерживали на свету ( $15 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ ) в растворе нафталина (Наф1,  $27 \text{ мг л}^{-1}$ ) и (Наф2,  $100 \text{ мг л}^{-1}$ ) или в воде (контроль, Д) в течение 24 ч. Затем часть листьев выдерживали в растворе АсК (3 мМ) в течение 30 мин (варианты: Д+АсК и Наф+АсК). Величины  $F_0$  и  $F_m$  в контроле приняты за 1.

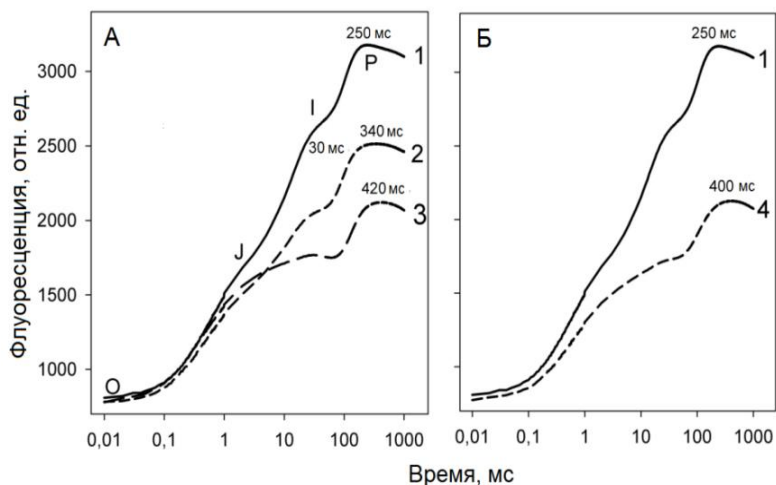
Вариант	Д	Наф1	Д+АсК	Наф1+АсК	Наф2
$F_v/F_m$	0,81 (0,008)	0,71 (0,02)	0,80(0,01)*	0,72(0,016)*	0,65 (0,04)
$F_0$	1(0,04)	1,3(0,08)	1,04(0,03)*	1,16(0,08)*	1,49(0,12)
$F_m$	1 (0,05)	1,05(0,03)*	1,0(0,045)*	0,92 (0,06)*	0,83 (0,07)
Хл, $\text{мг г}^{-1}$	1,64 (0,02)	1,70 (0,04)*	1,67(0,035)*	1,69 (0,04)*	1,54 (0,03)
Кар, $\text{мг г}^{-1}$	0,27 (0,006)	0,30 (0,05)*	0,28 (0,01)*	0,29 (0,03)*	0,26(0,03)*

\*- Разница между вариантом Д и опытными вариантами недостоверна ( $p > 0,05$ )

В этой связи на основе индукционных кривых были рассчитаны величины максимального и эффективного квантовых выходов ФС2 ( $F_v/F_m$ ) и  $(F_m' - F_T)/F_m'(Y(II))$ , характеризующих активность ФС2.

Величина ( $F_v/F_m$ ) для используемых листьев до обработок была  $0,81 \pm 0,007$ . После инкубации листьев в течение 24 ч в растворе Наф эта величина снизилась до  $0,72 \pm 0,02$ , величина  $Y(II)$  также уменьшалась. Достоверное снижение величины  $F_v/F_m$  до  $0,79 \pm 0,007$  наблюдали уже после 2-ч инкубации при концентрации Наф  $27 \text{ мг л}^{-1}$ , тогда как после одного часа инкубации с Наф при той же концентрации достоверный эффект не наблюдался. В уменьшение данного отношения вклад вносило преимущественно увеличение начальной флуоресценции –  $F_0$ , где  $F_0 = F_m - F_v$ , тогда как снижение величины  $F_m$  было менее значительным.

Для более детального понимания путей действия ПАУ на ФА был использован ЛР-тест, то есть быстрые изменения флуоресценции от минимального ( $F_0$ ) до максимального ( $F_M$ ) уровня в адаптированных к темноте растениях. Тест отражает процесс постепенного восстановления компонентов фотосинтетической ЭТЦ от первого стабильного акцептора электрона  $Q_A$  до пластохинонового пула и далее до конечных акцепторов электрона ФС1 и включает несколько фаз (Рис. 2).

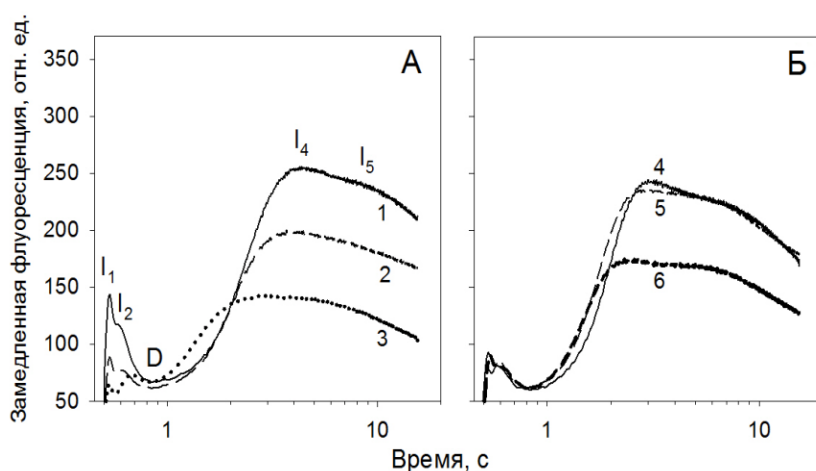


**Рис. 2.** Действие Наф и Фен на индукционные кривые БФЛ хлорофилла листьев гороха, выдержанных 24 ч на свету. А – ( $I = 15$  мкмоль квантов  $m^{-2} c^{-1}$ ) при содержании Наф ( $30$  мг  $л^{-1}$ ) (2) и  $100$  мг  $л^{-1}$  (3). Б –  $50$  мг  $л^{-1}$  Фен (4),  $I = 120$  мкмоль квантов  $m^{-2} c^{-1}$ . Листья без добавок (кривые 1). Типичные кривые из 10 повторов.

Показано, что снижение интенсивности флуоресценции при действии ПАУ

максимально в фазе IP, и менее выражено в OJ и II фазах. Мы предположили, что заметное уменьшение флуоресценции в фазе IP, обнаруженное в наших экспериментах, вероятно, связано с блокированием переноса электрона от  $Q_A$  к  $Q_B$ , по-видимому, вследствие роста числа  $Q_B$ -невосстанавливающих центров (Tomar, Jajoo, 2013; Lankin et al., 2014). Считается, что в таких центрах  $Q_A^-$  не восстанавливает  $Q_B$  до  $Q_B^-$ , а  $Q_A^-$  окисляется только путём обратной реакции с компонентами донорной стороны ФС2. На увеличение числа таких центров указывает меньшая амплитуда в точке P индукционной кривой и смещение временной позиции точки P от 250 мс (контроль) до 420 мс в присутствии  $100$  мг  $л^{-1}$  Наф и 400 мс для  $50$  мг  $л^{-1}$  Фен (Рис. 2). Это предположение подтверждается данными измерения числа  $Q_B$ -невосстанавливающих центров методом двойного импульса (Strasser, Tsimilli-Michael, 1998). Так, количество активных  $Q_B$ -восстанавливающих реакционных центров, рассчитанное на сечение возбуждения ФС2, снижалось через 2 сут выдерживания листьев на 34% для Наф ( $27$  мг  $л^{-1}$ ) и через 3 сут – на 31% для фенантрена. Аналогичный тренд был обнаружен при исследовании препаратов тилакоидных мембран. После 28 мин выдерживания суспензии ( $20$  мкг Хл на  $1$  мл) в темноте количество  $Q_B$ -невосстанавливающих РЦ фотосистемы 2 было  $30,5(0,5)\%$ , тогда как это количество при том же времени выдерживания суспензии с добавкой Наф ( $27$  мкг  $мл^{-1}$ ) было  $53,3(3)\%$ . Возможно, содержание таких комплексов связано с нативностью структуры мембранного комплекса ФС2, которая может нарушаться из-за замедления биосинтеза белка D1 (Larocca et al. 1996).

Для более детального представления о механизме действия ПАУ на ФА использовали метод замедленной флуоресценции Хл *a*. На Рис. 3 показана типичная кривая ЗФл, характеризующаяся двумя фазами: быстрой (максимумы  $I_1$  и  $I_2$ ) и медленной, разделенной «впадиной», называемой D (Lambrev and Goltsev, 2001; Goltsev et al., 2003, 2009;). Медленная фаза кривой ЗФл, представленная двумя компонентами с максимумами  $I_4$  и  $I_5$ , соответствует постепенному увеличению интенсивности флуоресценции после минимума D и отражает повышение трансмембранного протонного градиента, вызванного светом (Wraight, Crofts, 1971). Последний связан с состоянием тилакоидных мембран и скоростью электронного транспорта на акцепторной стороне ФС2, что зависит от окислительно-восстановительного состояния  $Q_A$  и пула PQ (Goltsev et al., 2009).

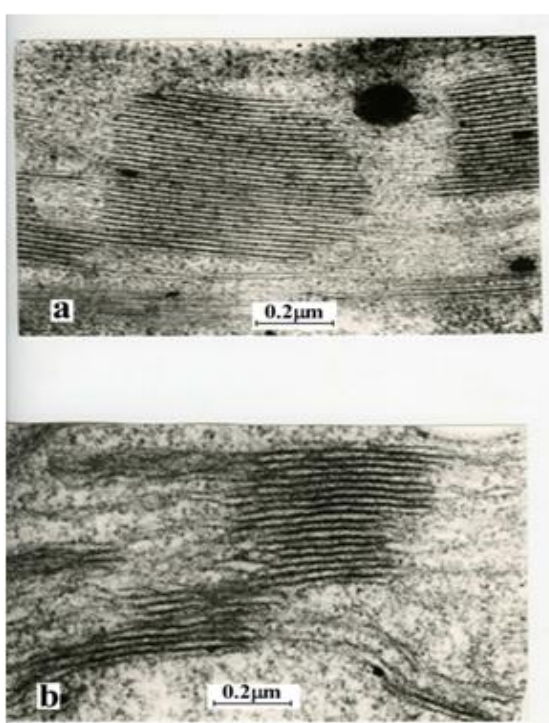


**Рис. 3.** Кривые ЗФл листьев гороха при воздействии Наф (А) и Фен (Б). 1, 4 – контроль 24 ч; 2 – Наф (30 мг л<sup>-1</sup>, 24 ч); 3 – Наф (30 мг л<sup>-1</sup>, 72 ч); 5 – Фен (1,2 мг л<sup>-1</sup>, 24 ч); 6 – Фен (50 мг л<sup>-1</sup>, 24 ч). Типичные кривые из 7 повторностей.

Наблюдается существенное снижение отношения ( $I_4 - D$ )/D) (Рис. 3), что говорит о снижении способности

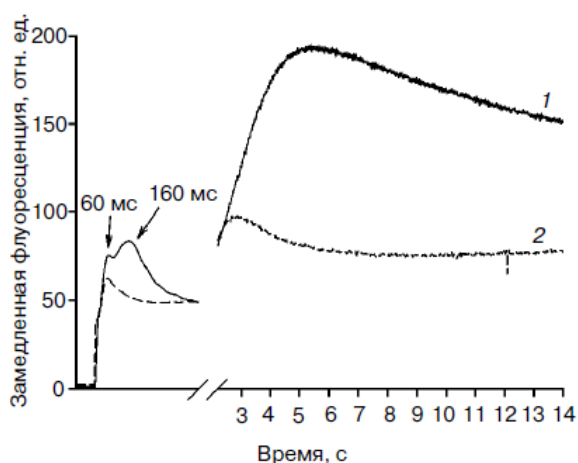
запасания световой энергии в виде образования  $\Delta pH$  на тилакоидных мембранах, и это согласуется со снижением величины  $\Psi(II)$ . Формирование  $\Delta pH$ , необходимого для высокого уровня нефотохимического тушения, требует функциональной целостности тилакоидных мембран (Zhang, Xing, 2008). Понижение  $\Delta pH$ , вероятней всего, связано с развитием окислительного стресса и понижением целостности тилакоидной мембраны. Это согласуется с данными электронной микрофотографии, в частности, заметным набуханием тилакоидов (Рис. 4).

В итоге мы предполагаем, что увеличение протонной утечки через мембрану может препятствовать восстановлению  $Q_B$  и последующему изменению  $\Delta pH$ . Нами показано, что наиболее заметно при действии нафталина снижаются быстрые компоненты ЗФл. По-видимому, ПАУ действуют на компоненты акцепторной стороны ФС2:  $Q_A$  и  $Q_B$ . Эта идея соответствует нашим данным об увеличении доли  $Q_B$ -невосстанавливающих реакционных центров ФС2 и согласуется с литературными данными анализов эффектов Флу на реакционные центры ФС2 (Tomar, Jajoo, 2013).



**Рис. 4.** Изменения ультраструктуры хлоропластов из листьев гороха, выдержанных 24 ч в присутствии Наф ( $30 \text{ мг л}^{-1}$ ) (b), и в отсутствии добавки (a)

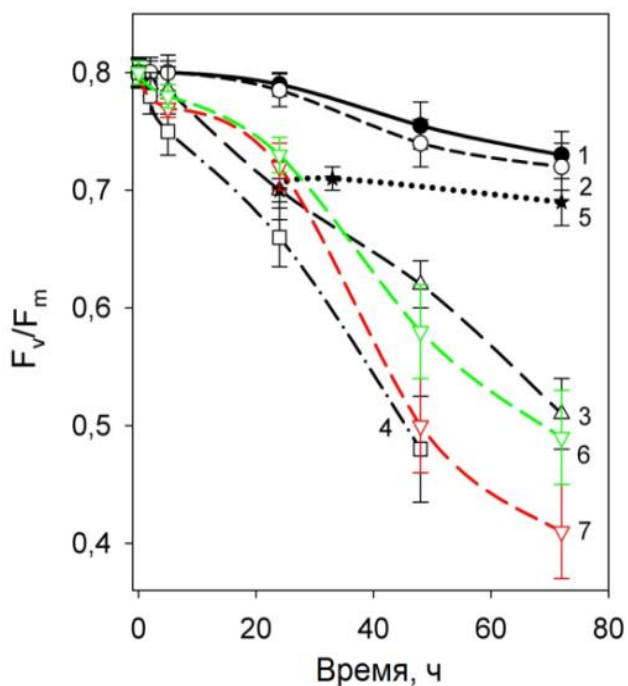
В зависимости от условий измерения и функционального состояния водоокисляющего комплекса ФС2 ЗФЛ хлорофилла *a* может высвечиваться в результате рекомбинации зарядов в парах  $[Q_A^- P_{680}^+]$ ,  $[Q_A^- Y_Z^+]$ , где  $P_{680}$  и  $Y_Z$  – первичный и вторичный доноры электрона ФС2, хлорофилл  $P_{680}$  и *тирозин-161* Д1-белка, соответственно; а также в парах  $[Q_A^- S_n^+]$ ,  $[Q_B^- P_{680}^+]$ ,  $[Q_B^- Y_Z^+]$ , и  $[Q_B^- S_n^+]$ , где  $S_n$  – одно из S-состояний водоокисляющего комплекса ФС2 (Kalaji et al., 2012a). В присутствии диурана, блокирующего перенос электронов от  $Q_A$  к  $Q_B$ , миллисекундная ЗФЛ возникает в основном в результате рекомбинации зарядов между  $Q_A^-$  и положительно заряженными компонентами донорной стороны ФС2. По нашим данным относительная амплитуда быстрой компоненты ЗФЛ ( $(I_1 - D)/D$ ) с максимумом  $\sim 50$  мс, наиболее соответствующим времени жизни пары  $[Q_A^- Y_Z^+]$ , в наименьшей степени снижается в результате обработки диуроном (Рис. 5). По-видимому, наиболее быстрая компонента  $I_1$  в большей степени, чем другие компоненты, связана с рекомбинацией зарядов в паре  $[Q_A^- Y_Z^+]$ .



**Рис. 5.** Влияние диурана на кривую ЗФЛ. Листья инкубировали 30 мин в растворе диурана (40 мкМ) (2) и в дистиллированной воде без диурана 30 мин (1). Показаны типичные кривые из 5 повторов.

Простые ароматические соединения, такие как бензол, обладают сильным токсическим эффектом на растения, поскольку они быстро проникают через мембраны, тогда как у ПАУ способность проникать ниже. С другой стороны, из наших данных следует, что существует аккумулирующий эффект негативного действия ПАУ на активность ФС2. Это согласуется с тем, что Наф действует эффективнее на ФА после 24 ч выдержки по сравнению с Фен и Флу, однако через 48 и 72 ч их действие становится сильнее, чем действие нафталина при той же концентрации (Рис. 6). Отсюда можно заключить, что кратковременные эффекты действия ПАУ на

активность ФА в первую очередь определяются водной растворимостью и доступностью для них различных клеточных мишеней.

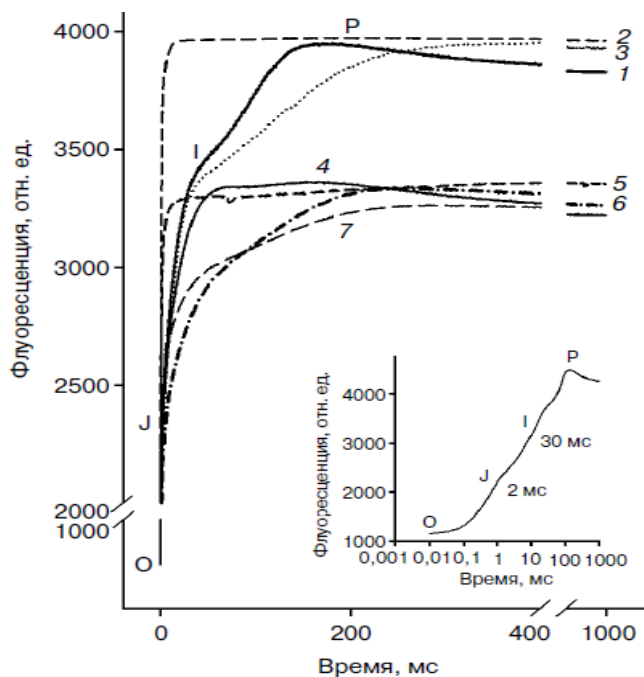


**Рис. 6.** Влияние Наф (1–5), Фен (6) и Флу (7) на максимальный квантовый выход флуоресценции в зависимости от времени выдерживания листьев в воде на свету 15 мкмоль квантов м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>. 1 – без добавок, 2 – 1 мг л<sup>-1</sup> Наф, 3, 6, 7 – 30 мг л<sup>-1</sup> Наф, Фен и Флу, соответственно, 4 – 100 мг л<sup>-1</sup> Наф, 5 – листья выдерживали 24 ч в растворе нафталина (30 мг л<sup>-1</sup>), затем промывали и выдерживали промытые листья 48 ч в воде.

ФС2 гетерогенна как по структуре, так и по функции (Govindjee, 1990; Bukhov, Carpentier, 2000; Tomar, Jajoo, 2013). Известно два типа гетерогенности ФС2: гетерогенность антенны и гетерогенность акцепторной стороны ФС2. Оба типа гетерогенности могут

быть нарушены при действии некоторых ПАУ. Так, в растениях сои обработка антраценом приводила к снижению квантового выхода ФС2, снижению числа активных РЦ ФС2 при увеличении концентрации антрацена (Tomar et al., 2015). Кроме того, изменялась гетерогенность свето-собирающего антенного комплекса ФС2. Эффективные  $\alpha$ -центры ССК ФС2 конвертировались в менее эффективные, что ухудшало эффективность переноса энергии к РЦ ФС2.

Для исследования возможного механизма действия нафталина на активность ФС2 был использован экзогенный донор электрона – аскорбат натрия и ингибитор транспорта электрона на акцепторной стороне ФС2 – диурон, который замещает вторичный хиноновый акцептор  $Q_B$  в его связывающем участке на D1-белке ФС2 (Velthuys, 1981), и, следовательно, блокирует перенос электрона от  $Q_A$  к  $Q_B$ . Ингибирование реокисления восстановленного  $Q_A$  диуроном сопровождалось характерными изменениями кинетики индукционных кривых (ОЛР), в частности, наблюдается практически одна фаза – J (Рис. 7). Эта фаза соответствует восстановлению первичного акцептора электрона  $Q_A$ .



**Рис. 7.** Кинетики БФЛ в присутствии добавок. Листья инкубировали 24 ч в воде (1); затем часть листьев инкубировали 1 ч в растворе диурона (2) или 30 мин в растворе аскорбата натрия (АсК) (3), другую часть – в растворе Наф (4) 24 ч. Затем часть листьев инкубировали 1 ч в растворе диурона (5) или 30 мин в растворе АсК (6), а также в смешанном растворе: диурон (1 час) + АсК (30 мин) (7). Концентрации Наф, диурона и АсК равны 0,21 мМ, 40 мкМ и 3 мМ, соответственно. Внизу показана типичная кривая ОJIP.

Фазы индукционной кривой, следующие после J, преимущественно связаны с восстановлением пластохинона  $Q_V$ , пула пластохинонов,

а также отчасти с восстановлением конечных акцепторов электрона ФС1 (Sirbet, Govindjee, 2011). Анализируя кинетики БФЛ, мы предположили, что Наф влияет, прежде всего, на акцепторную сторону ФС2, вероятно, через снижение эффективности переноса электрона с  $Q_A$  на  $Q_V$  и далее по ЭТЦ до конечных акцепторов электрона ФС1, и, в меньшей степени, через снижение эффективности реакции разделения зарядов в РЦ ФС2 и переноса электрона на  $Q_A$ . Это предположение подтверждается результатами, полученными на листьях после инкубации в присутствии нафталина, например, данными об уменьшении площади над кривой индукции БФЛ, которая характеризует ёмкость пула активных молекул пластохинона; снижением значения величины  $\tau_{1/2}$ ; а также тем, что после обработки быстрая компонента (OJ), связанная с восстановлением  $Q_A$  (Гольцев и др., 2014), снижалась в меньшей степени, чем амплитуды более медленных компонент.

Учитывая факт снижения амплитуды быстрой компоненты ЗФЛ в препаратах тилакоидных мембран, предполагаем, что воздействие Наф на тилакоидные мембраны приводит к увеличению доли  $Q_V$ - невосстанавливающих РЦ ФС2, и, таким образом, изменяет гетерогенность акцепторной стороны ФС2. Вывод об ингибировании переноса электрона на акцепторной стороне согласуется также с данными по влиянию Наф на параметры, рассчитанными из кинетик ОJIP в эксперименте, где одновременно на ФА листьев действовали и диурон, и Наф. Характерные эффекты диурона в листьях, обработанных нафталином, по сравнению с необработанными листьями, были менее выраженными (Рис. 7). Это объясняется тем, что Наф оказывает ингибирующее действие на активность ФС2, и это проявляется в виде эффектов, подобных эффектам диурона. С другой стороны, ингибирование ФА

листьев, предобработанных Наф, в присутствии экзогенного донора электрона, аскорбата натрия, приводило к частичному восстановлению формы кривой ОЛР и соответствующих флуоресцентных параметров, что предполагает ингибирование нафталином также и донорной стороны ФС2. При действии Фен и Флу мы наблюдали те же тенденции (Kreslavski et al., 2014, рис. 3 и 6). По-видимому, эти ПАУ действуют аналогичным образом.

Окислительно-восстановительное состояние первичного хинонового акцептора электрона ФС2,  $Q_A$ , определяет выход флуоресценции  $X_{la}$  и изменения интенсивности фазы ОJ в ОЛР-переходах (Van Gorkom, 1986). В стационарных условиях измерения восстановление  $Q_A$  в препаратах ФС2 на насыщающем свете достигает своего максимума через 2 мс ( $I_{2ms}$ ) после начала освещения (Рис. 7). Нами показано, что скорость восстановления  $Q_A$  до  $Q_A^-$  в результате поглощения экситона в РЦ ФС2 в расчете на РЦ (величина  $TR_0/RC$ ) и скорость поглощения фотонов хлорофиллом антенны ФС2 в расчете на число активных РЦ (величина  $ABS/RC$ ) возрастают в результате действия Наф (Табл. 2). Обнаруженное нами возрастание скорости восстановления  $Q_A$  до  $Q_A^-$ , возможно, связано с увеличением числа неактивных РЦ ФС2.

**Таблица 2.** Влияние Наф, диурина и аскорбата натрия на флуоресцентные параметры, рассчитанные на основе индукционных кривых БФл (ОЛР-переходы). Листья инкубировали на свету (15 мкмоль квантов  $m^{-2} c^{-1}$ ) в растворе Наф (27 мг  $л^{-1}$  (Наф1) и 100 мг  $л^{-1}$  (Наф2)) или в дистиллированной воде (Д) в течение 24 ч. Затем листья выдерживали 30 мин в растворе диурина (30 мкМ), аскорбата натрия (3 мМ) (варианты: Д + диурон, Наф + диурон и Наф+Аскорбат). (Ланкин и др., 2014).

Вариант	Д	Д+диурон	Наф1	Наф1 +диурон	Наф1+ аскорбат	Наф2
$\tau_{1/2}$ , мс	3,6 (0,14)	0,47 (0,07)	1,9 (0,25)	0,85 (0,06)	3,06(0,11)	1,1 (0,08)
$\Phi_{ET_0}=ET_0/ABS$	0,53 (0,03)	0,08 (0,07)	0,40 (0,02)	0,14 (0,05)	0,46(0,02 )	0,25(0,03)
$TR_0/RC$	1,33(0,1)	1,78(0,12)	1,55(0,06)	1,65(0,2)	1,53(0,11)	1,82(0,14)
$ABS/RC$	1,66 (0,07)	—	2,15(0,11)	—	—	2,85(0,11)
$ET_0/RC$	0,97 (0,02)	0,21 (0,02)	0,88 (0,024)	0,35(0,03)	0,98(0,05)	0,81(0,025)
$\Psi_0=ET_0/TR_0$	0,73(0,02)	0,12(0,003)	0,56(0,06)	0,21(0,04)	0,63(0,06)	0,445(0,1)
$\Phi_{RE_0}=RE_0/ABS$	0,31(0,02)	0,002(0,001)	0,15(0,035)	0,06(0,01)	0,30(0,03)	0,08(0,04)
$RC/CS$	0,91(0,03)	0,83(0,025)	0,84(0,04)	0,93(0,06)	0,84(0,03)	0,76(0,02)
$S_m$	1	—	0,40(0,06)	—	1,05(0,12)	0,35(0,09)

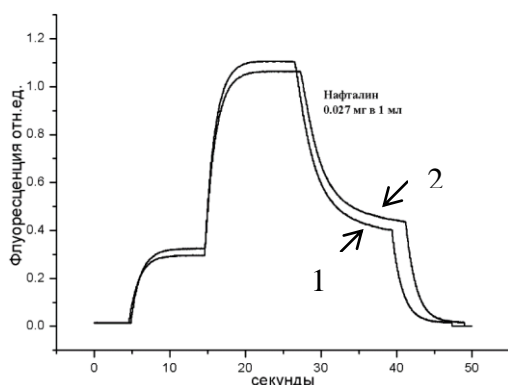
- Величина  $S_m$  в контроле принята за 1.

Действие Наф приводило к снижению квантовых выходов электронного транспорта на участке  $Q_A-Q_B$  ( $\Phi_{ET_0}$ ) и от  $Q_A$  до конечных акцепторов электрона ФС1 ( $\Phi_{RE_0}$ ), что наряду со снижением пула восстановленных пластохиноновых переносчиков (Табл. 2) свидетельствует об ингибировании нафталином активности

акцепторной стороны ФС2.

Этот результат согласуется со снижением амплитуды быстрой компоненты ЗФл –  $I_2$  в результате действия Наф. Нами обнаружено более значительное снижение величины  $\phi_{PE_0}$  по сравнению с величиной  $\phi_{E_0}$  в листьях после их инкубации в растворе Наф. Это позволяет предположить, что Наф снижает скорость электронного транспорта не только на участке от  $Q_A$  к  $Q_B$ , но и в других местах цепи переноса электрона, возможно, на участках между ФС2 и ФС1. При этом есть корреляция между снижением величины  $\phi_{E_0}$  и отношения  $RC/CS$  при увеличении концентрации Наф. Вероятно, снижение обеих величин обусловлено снижением количества активных  $Q_B$ -восстанавливающих центров ФС2. Аналогичным образом действовал Фен, но эффекты были менее выражены по сравнению с Наф, видимо, из-за его меньшей растворимости в воде.

Как и ожидалось, для препаратов тилакоидных мембран наблюдались те же тенденции, что и для листьев, но чувствительность к действию Наф была заметно выше. Так, эффект Наф в препаратах тилакоидных мембран наблюдался при концентрации  $4 \text{ мг л}^{-1}$  после 10 минут выдержки в темноте (Kreslavski et al., 2014). Величина  $F_0$  возрастала, уменьшалась величина  $F_m$  и замедлялся темновой спад  $F_m$ , отражающий темновое реокисление восстановленного  $Q_A^-$  (Рис. 8). Эти данные свидетельствуют о начале блокирования переноса электрона между  $Q_A$  и  $Q_B$  и согласуются с обнаруженным на листьях снижением квантового выхода электронного транспорта на участке  $Q_A$ - $Q_B$  ( $\phi_{E_0}$ ) при действии Наф и Фен.



**Рис. 8.** Фотоиндуцированные изменения флуоресценции  $\Delta F$ , измеренные на тилакоидах гороха, в присутствии  $27 \text{ мг л}^{-1}$  Наф (верхняя стрелка) и без добавок (нижняя стрелка). Инкубировали в темноте 30 мин.

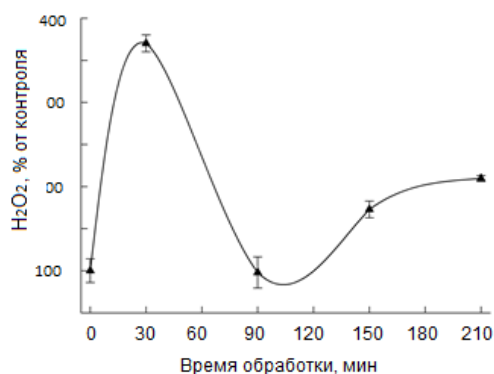
Возможно, Наф, действуя на мембранные липиды, влияет через них на антенный комплекс ФС2. Это может приводить к нарушению сопряжения между молекулами Хл в антенном комплексе, и в результате, к усилению флуоресценции антенного Хл, что может быть причиной повышения уровня  $F_0$  (Табл. 1).

Мембранные реакции, в частности повышение проницаемости мембран, происходят достаточно быстро и являются одними из первичных ответов клетки на действие стрессоров различной природы. Нами обнаружено повышение электропроводности водных растворов при внесении листьев, предварительно выдержанных в растворе Наф (Ланкин др., 2014), по сравнению с листьями не инкубированными с Наф, что свидетельствует об индукции нафталином выхода



ионов из листьев в раствор. Этот эффект наблюдался уже через 15 минут после внесения Наф, значительное увеличение пула  $H_2O_2$  было обнаружено через 30 минут. Вероятно, увеличение проницаемости мембран в данном случае сопряжено с последующими изменениями содержания  $H_2O_2$  и других АФК и предшествует снижению активности ФС2. Снижение содержания Хл и каротиноидов при высокой концентрации Наф и других ПАУ также может вносить вклад в уменьшение активности ФС2, в частности путем увеличения минимальной флуоресценции Хл –  $F_0$  (Krause, Weis, 1991).

Помимо действия ПАУ на мембраны другим механизмом негативного влияния ПАУ на ФА может быть генерация АФК (Alkio et al., 2005; Liu et al., 2009). Действие нафталина, (30 и 100 мг л<sup>-1</sup>) приводило в наших экспериментах к развитию окислительного стресса, что подтверждается быстрым нарастанием уровня  $H_2O_2$  со временем (Ланкин и др., 2014, рис. 9). Максимальное повышение содержания  $H_2O_2$  во всех случаях наблюдали через 30 мин после применения Наф. Затем оно снижалось до исходного уровня за 3 ч и 2 ч при содержании нафталина 30 и 100 мг л<sup>-1</sup>, соответственно, затем вновь возрастало (Рис. 9). Изменения в параметрах БФл и ЗФл за этот период были незначительны. Это может объясняться тем, что быстрый подъем содержания  $H_2O_2$  в листьях связан с его образованием в цитоплазматической мембране под действием Наф.



**Рис. 9.** Изменение содержания  $H_2O_2$  в листьях гороха от времени их выдерживания с Наф при его содержании 100 мг л<sup>-1</sup>.

Предполагается, что негативное действие ПАУ на ФА, вероятно, связано с развитием окислительного стресса и генерацией АФК (Alkio et al., 2005), что сопровождается сильным разрушением плазматической мембраны. При этом изменения на уровне тилакоидных мембран были не столь выражены (Рис. 4). Поэтому мы считаем, что прямое образование АФК в хлоропластах не обязательно является основной причиной затруднения фотовосстановления  $Q_B$ , но последнее может быть результатом ответной реакции ФА растения на повышение содержания АФК. Усиление образования АФК у высших растений из-за Флу и Фен было также найдено в ряде предыдущих исследований (Alkio et al., 2005; Liu et al., 2009; Babula et al., 2012; Oguntimehin et al., 2008, 2013), в которых проводились долговременные эксперименты. Скорее всего, эти авторы наблюдали эффекты накопления данных веществ и/или продуктов их разложения, вызывающих окислительный стресс.

Одним из факторов, усиливающих ингибирующее действие многих стрессоров, являются свет высокой интенсивности (Murata et al., 2007) и многие химические

соединения (Kummerova et al., 2006). В этой связи исследовали влияние комбинированного действия Наф и сильного света. Было показано, что ингибирующее воздействие Наф заметно усиливается на свету высокой интенсивности (Kreslavski et al., 2014). Ещё больший ингибирующий эффект был обнаружен в присутствии детергента (0,01% Tryton-X100) и ацетона (4%). Таким образом, ингибирующий эффект ПАУ может усиливаться за счёт их совместного действия с другими стрессовыми факторами.

Одним из путей формирования стресс-защитных механизмов, снижающих образование АФК, является повышение скорости тепловой диссипации поглощённой хлорофиллом световой энергии в РЦ и антенных комплексах фотосистем, прежде всего ФС2 (Гольцев и др., 2014). По-видимому, при низком уровне окислительного стресса, индуцируемого ПАУ, повышается скорость диссипации поглощённой энергии в тепло. Это согласуется с полученными результатами по влиянию Наф на параметры БФЛ, в частности, параметр  $DI_0/RC$ , который отражает эффективность тепловой диссипации поглощённой энергии. Этот показатель возрастал с 0,22 до 0,34 для Фен ( $1,3 \text{ мг л}^{-1}$ ) и до 0,52 в случае Наф (Табл. 2). Аналогично увеличение этого параметра было обнаружено в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* cw92 при внесении антрацена (Аксманн, Тукаж, 2008). Нефотохимическое тушение также возрастало на начальном этапе действия Наф по мере проникновения его в листья и генерации АФК по мере развития окислительного стресса. Так, если до внесения Наф  $100 \text{ мг л}^{-1}$  оно было 0,67 и через 0,5 ч – 0,77, то через 1,5 ч и 3 ч оно возрастало до 2,35 и 2,2, соответственно.

Судя по полученным данным, Наф наиболее эффективно ингибирует активность ФС2, вероятно, из-за того, что он наиболее хорошо растворим в воде по сравнению с другими ПАУ, что согласуется с его коэффициентом распределения октанол-вода ( $K_{ow}$ ), где  $\log K_{ow}$  для Флу, Фен и Наф равны 4,90, 4,45 и 3,37, соответственно (Fetterolf, 1998). По нашим данным значительный эффект Наф на индукционные кривые ЗФЛ проявляется уже при его концентрации около  $30 \text{ мг л}^{-1}$  (Рис. 3). Это соответствует данным, полученным на тилакоидах (Рис. 4), которые набухали и были несколько толще в образцах, обработанных Наф, по сравнению с контролем (Kreslavski et al., 2014). ПАУ, вероятно, являются причиной изменений в тилакоидных мембранах, ведущих к понижению фотохимической активности ФС2. Во-первых, ПАУ, должно быть, связываются с липидными компонентами цитоплазматической мембраны и изменяют её состояние, в частности, проницаемость, параллельно с формированием дополнительных количеств АФК, особенно  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В дальнейшем ПАУ могут взаимодействовать с внешней мембраной хлоропластов и, в конечном счёте, с тилакоидными мембранами и, таким образом, индуцировать понижение

активности ФС2. Этот процесс может занимать несколько часов. Эта идея иллюстрируется действием Наф при содержании  $100 \text{ мг л}^{-1}$ , когда, по нашему предположению, первый максимум в содержании  $\text{H}_2\text{O}_2$  отражает повреждение цитоплазматической мембраны, а второй – мембран оргanelл (Рис. 9).

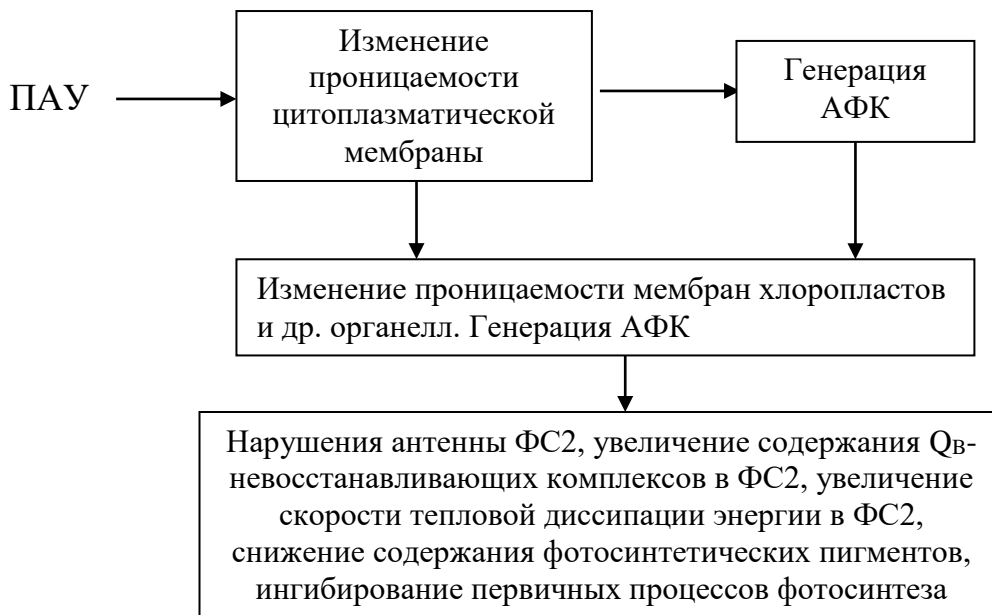
## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Механизмы подавления активности ФС2 и ФА в целом, а также деградации фотосинтетических пигментов при действии ПАУ на растения ещё неясны во многих деталях. Недостаточно изучены мишени действия нафталина в ФС2, быстрые ответные реакции ФА при действии нафталина, когда образование продуктов его трансформации маловероятно. Следует заметить, что эксперименты с ПАУ во многих исследованиях охватывают временной диапазон в течение несколько недель (Kummerova et al., 2006; Jajoo et al., 2014; 2015), что усложняет понимание механизмов их эффектов на активность ФА. Также во многом неясна связь между фотосинтетическими ответными реакциями при действии ПАУ, изменениями баланса оксидантов и антиоксидантов и структуры тилакоидных мембран.

Согласно нашим данным, при воздействии ПАУ увеличивается скорость диссипации поглощённой ФС2 энергии в тепло, особенно в условиях слабого стресса на начальном этапе. Также возрастает  $F_0$ , величина начального уровня флуоресценции, что может быть связано с нарушением сопряжения молекул хлорофилла в ССК ФС2, а также с переходом части ССК ФС2 в сторону ФС1. С другой стороны, снижаются скорости электронного транспорта, особенно на участке  $Q_A-Q_B$  и до конечных акцепторов электрона ФС1. Также снижается скорость восстановления  $Q_A$ , что свидетельствует о нарушении ФС2 на начальных этапах переноса электрона.

Полученные данные объясняются увеличением количества центров ФС2, в которых не происходит восстановление  $Q_A$  до  $Q_A^-$  и/или  $Q_B$  до  $Q_B^-$  при увеличении концентрации ПАУ и времени экспозиции. Эти выводы согласуются с данными по исследованию влияния Наф на препараты тилакоидных мембран, из которых следует, что ингибирование активности ФС2 в основном происходит в результате снижения скорости переноса электрона на участке  $Q_A-Q_B$ .

На основе сравнения тенденций действия ПАУ на параметры флуоресценции Хл сделан вывод, что пути воздействия различных ПАУ (Рис. 2, 3, 6) подобны (Kreslavski et al., 2014). Предполагается, что ПАУ накапливаются в липофильных системах клеток, особенно в биомембранах (Babula et al., 2012), снижая их проницаемость и нарушая структуру (Рис. 10).



**Рис. 10.** Схема действия ПАУ на ФА высших растений.

Вероятно, Наф и другие ПАУ действуют, в основном, на акцепторную, по-видимому, преимущественно на участке  $\text{ФС2}-\text{Феоф}-\text{Q}_\text{А}-\text{Q}_\text{В}(\text{PQ})$  и, в меньшей степени, на донорную сторону  $\text{ФС2}$ .

ФА и его функционирование неразрывно связаны с тилакоидными мембранами, основу которых составляет двойной слой липидных молекул. Хлорофиллы, как антенны, так и РЦ связаны с белково-липидным комплексом. Поэтому закономерно, что липофильные ПАУ могут влиять на ФА путем изменения состояния и организации липидов тилакоидных и других мембран.

Предложенная нами схема возможного механизма действия ПАУ на ФА (Рис. 10) основана на идее повышения проницаемости мембран при действии ПАУ и вследствие этого генерации АФК. Согласно этой схеме действие ПАУ приводит к нарушению антенных комплексов  $\text{ФС2}$ , увеличению содержания  $\text{Q}_\text{В}$ -невосстанавливающих комплексов и увеличению скорости тепловой диссипации энергии в  $\text{ФС2}$ , а при длительном действии ПАУ и/или высокой концентрации к снижению содержания фотосинтетических пигментов.

Понимание механизмов действия стрессовых факторов на ФА позволит эффективно контролировать пути повышения устойчивости растений к стрессовым факторам, и, следовательно, регулировать их продуктивность.

## ВЫВОДЫ

1. Вызванное действием полиароматических углеводородов снижение квантовых выходов переноса электрона от  $Q_A$  к  $Q_B$  ( $\Phi_{ET0}$ ), а также вплоть до акцепторов электрона фотосистемы 1 ( $\Phi_{RE0}$ ), и повышение диссипации поглощённой фотосистемой 2 световой энергии в тепло ( $DI_0/RC$ ) объясняется увеличением количества неактивных реакционных центров ФС2 и нарушением передачи энергии возбуждения в свето-собирающем комплексе этой фотосистемы.

2. Количество активных реакционных центров ФС2, квантовый выход переноса электронов вплоть до конечных акцепторов электрона ФС1, величина тепловой диссипации энергии поглощённого света в расчете на РЦ ФС2 и нефотохимическое тушение (NPQ) являются наиболее чувствительными параметрами при действии ПАУ.

3. При повышенном содержании нафталина ( $100 \text{ мг л}^{-1}$ ) обнаружено двухступенчатое по времени увеличение содержания  $H_2O_2$  в листьях гороха, что может быть связано первоначально с нарушениями липидного бислоя мембраны плазмалеммы, а затем с нарушением липидного бислоя мембран клеточных органелл.

4. На основе полученных данных флуоресценции хлорофилла сделан вывод, что, что действие нафталина, типичного представителя ПАУ, на листья приводит к нарушению интактности клеточных мембран, образованию активных форм кислорода и действует, в основном, на акцепторную и, в меньшей степени, на донорную сторону ФС2.

5. Сравнение эффективности действия трёх использованных нами ПАУ на фотохимическую активность ФС2 показало, что кратковременные эффекты действия ПАУ в основном определяются их водной растворимостью.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

*Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ*

1. Kreslavski V.D., Lankin A.V., Vasilyeva G.K., Luybimov V.Yu., Semenova G.N., Schmitt F.-J., Friedrich T., Allakhverdiev S.I. (2014) Effects of polyaromatic hydrocarbons on photosystem II activity in pea leaves. *Plant Physiol. Biochem.*, 81, 135-142.

2. Ланкин А.В., Креславский В.Д., Худякова А.Ю., Жармухамедов С.К., Аллахвердиев С.И. (2014) Влияние нафталина на фотохимическую активность фотосистемы 2. *Биохимия*, 79, 1493 – 15046.

*Статьи в других изданиях и материалах конференций*

1. Ланкин А.В., Креславский В.Д., Аллахвердиев С.И. (2013) Влияние полициклических ароматических углеводородов на ФСII растений гороха. Материалы

научной конференции «Физиология растений и микроорганизмов – взгляд в будущее», Томск, ТГУ, с. 136 – 138.

2. Ланкин А.В., Креславский В.Д., Аллахвердиев С.И. (2013) Влияние полициклических ароматических углеводов на фотосинтетический аппарат растений гороха. Материалы 17 международной Пущинской школы-конференции молодых учёных, Пущино, с. 494.

3. Ланкин А.В., Креславский В.Д., Аллахвердиев С.И. (2013) Ингибирующий эффект полициклических ароматических углеводов на первичные процессы фотосинтеза. Материалы X Международного симпозиума «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования» Том I, Пущино, с. 213 – 216.

4. Худякова А.Ю., Сивашева Т.Н., Креславский В.Д., Ланкин А.В. (2014) Измерение замедленной флуоресценции хлорофилла и кинетики её затухания при воздействии на растения стрессовых факторов. Материалы 18 международной Пущинской школы-конференции молодых учёных, Пущино, с. 50.

5. Ланкин А.В., Креславский В.Д., Худякова А.Ю. (2014) Влияние полиароматических углеводов на фотохимическую активность фотосистемы 2 листьев гороха. Материалы 18 международной Пущинской школы-конференции молодых учёных, Пущино, с. 390.