

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 57.044+579.695

Краситель 10-N-нонилакридиновый оранжевый как флуоресцентный индикатор действия антисептика октенидина на мембраны хроматофоров *Rhodobacter sphaeroides*

Е.П. Лукашев¹ , П.П. Нокс¹, М.Г. Страховская^{2,*} , В.З. Пашенко¹¹Кафедра биофизики и ²кафедра синтетической биологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: maristra@yandex.ru

Возрастающие объемы производимых антисептиков и дезинфектантов, которые широко применяются в медицине, ветеринарии, пищевой промышленности и быту, после использования могут представлять серьезную экологическую проблему. Ранее при изучении действия ряда антисептиков в микромолярных концентрациях мы выявили нарушения функционирования фотосинтетических мембран и выделенных из них фототрансформирующих пигмент-белковых комплексов у разных представителей фотосинтезирующих организмов. В настоящей работе для определения чувствительности фотосинтетических мембран к действию катионного антисептика октенидина использованы хроматофory пурпурных несерных бактерий *Rhodobacter sphaeroides*, меченные флуоресцентным красителем 10-N-нонилакридиновым оранжевым (НАО). Показано, что связывание НАО с хроматофорами сопровождается сдвигом максимума излучения красителя от 525 к 640 нм. «Красная» флуоресценция связанного с хроматофорами НАО оказалась чувствительна к действию на фотосинтетические мембраны октенидина в возрастающих концентрациях. Установлены концентрации антисептика, при которых он приводит к деградации структур хроматофоров и изменению агрегатного состояния НАО, что можно обнаружить по усилению «зеленой» флуоресценции в спектрах излучения красителя. Обсуждаются свойства НАО в качестве флуоресцентного индикатора функционального состояния фотосинтетических мембран и потенциальных изменений, которые могут происходить в таких системах под влиянием катионного антисептика.

Ключевые слова: пурпурные несерные бактерии, хроматофory, фотосинтетические мембраны, флуоресценция, 10-N-нонилакридиновый оранжевый, антисептик октенидин

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-1-2

Введение

Антисептиками называют противомикробные средства широкого спектра действия для обеззараживания кожи, слизистых, раневых поверхностей. В настоящее время антисептики активно используются не только в здравоохранении и ветеринарной медицине, но также в быту для обработки кожи рук и как компоненты зубных паст, ополаскивателей полости рта и других средств личной гигиены [1, 2]. Свой вклад в массовое применение антисептиков и рост их производства внесла и пандемия COVID-19. В качестве действующего вещества антисептики могут содержать йод, перексид водорода, спиртовые компоненты и др. Высокой эффективностью обладают катионные антисептики [3] на основе бигуанидов (хлоргексидин) и четвертичных аммониевых соединений (ЧАС), в частности, бензалкония хлорид и октенидин. ЧАС также широко

используются в составе дезинфектантов для обеззараживания поверхностей [4].

После использования антисептики и дезинфектанты наиболее часто попадают непосредственно в сточные воды. Так, в сточных водах медицинских учреждений концентрация хлоргексидина может достигать 10,3 мкг/мл, а в бытовых водах — 4,5 мкг/мл [5]. По оценке, сделанной ранее [6], до 25% используемых ЧАС сбрасываются непосредственно в окружающую среду, загрязняя поверхностные воды, осадочные материалы водоемов и почву, а 75% поступает в системы очистки сточных вод, в большинстве своем не предназначенные для удаления такого рода микропримесей. Они оказывают негативное действие на активный ил, способствуют выработке перекрестной устойчивости входящих в него микроорганизмов [7], накапливаются в осадках очистных сооружений [8].

С загрязненными сточными водами и осадками очистных сооружений антисептики и дезинфектанты попадают в окружающую среду, где лишь частично подвергаются биodeградации [9]. Показано, что хлоргексидин вызывает уменьшение доли биомассы зеленых водорослей и цианобактерий в речной воде [10], а ЧАС, накапливаясь в осадочных материалах [11], уменьшают видовое разнообразие в микробных сообществах.

Очевидно, с течением времени в окружающей среде будут накапливаться все большие количества антисептических средств с длительным временем жизни, способностью к биоаккумуляции и высокой экотоксичностью, что требует повышенного внимания к этой проблеме и постоянного мониторинга. В этой связи представляет безусловный интерес поиск индикаторов функционального состояния биомембран при воздействии на них такого рода соединений.

В цикле работ [12–15] мы исследовали влияние катионных антисептиков (хлоргексидин, пиклоксидин, мирамистин, октенидин) в микромолярных концентрациях на фотосинтетические мембраны и изолированные из них фототрансформирующие пигмент-белковые комплексы разных представителей фотосинтезирующих организмов – от пурпурных бактерий до цианобактерий и высших растений. В частности, пурпурные несерные бактерии, хромофоры которых могут служить удобным объектом тестирования воздействия антисептиков на аппарат фотосинтеза, являются факультативно аэробными фотоорганогетеротрофными грамотрицательными бактериями, которые, осуществляя аноксигенный фотосинтез, используют в качестве доноров электронов органические соединения. Они обитают в илистой почве, богатых органикой водоемах, осадках сточных вод, входят в состав активного ила [16], то есть присутствуют там, где высока вероятность накопления дезинфектантов и антисептиков.

В результате воздействия антисептиков было выявлено нарушение функциональных процессов переноса световой энергии между мембранно-связанными светособирающими комплексами (ССК), доставки энергии возбуждения к собственному фотосинтетическим реакционным центрам (РЦ), процессов переноса электронов в РЦ фотосистемы 1, эффективности работы кислород-выделяющего комплекса фотосистемы 2. При этом при общем сходстве вызываемых эффектов наиболее ярко выраженное воздействие наблюдалось у октенидина.

Результатом обнаруженного нами воздействия антисептиков были и очевидные структурные нарушения в фотосинтетических мембранах и мембранно-связанных пигмент-белковых комплексах. Появление продуктов деградации бактериохлорофилла (Бхл) в виде бактериофеофитина [12, 13] и молекул свободного мономерного хлорофилла [14, 15] сви-

детельствуют уже о разрушении этих мембран и их фототрансформирующих комплексов в присутствии антисептика в высоких концентрациях. В дальнейшем развитии этих исследований представляет интерес использование индикаторов структурного состояния фотосинтетических мембран, которые отражали бы состояние гидрофобных областей изучаемых объектов при воздействии на них антисептиков, в том числе при умеренных концентрациях последних, еще не вызывающих очевидной деградации мембран. В этой связи привлекает внимание возможность использования в данных целях флуоресцентного красителя 10-N-нонилакридинового оранжевого (НАО), который уже давно применяется в качестве селективного индикатора кардиолипина в биомембранах. Считают, что НАО способен связываться с отрицательно заряженными липидами не только благодаря зарядовому взаимодействию и водородной связи с полярной головкой липида, но также и благодаря гидрофобным взаимодействиям, обусловленным длинным ацильным хвостом НАО. При этом именно гидрофобные взаимодействия играют, по видимому, преобладающую роль [17–19].

В настоящей работе мы исследовали влияние наиболее «эффективного» в группе изучаемых нами катионных антисептиков октенидина на мембраны хромофоров пурпурных несерных бактерий *Rhodobacter sphaeroides*, меченных НАО.

Материалы и методы

Выращивание бактерий *R. sphaeroides* дикого типа и выделение из клеток хромофоров проводили, как описано ранее [20]. Хромофоры, представляющие собой замкнутые везикулярные частицы, суспендировали в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7,5) и хранили при температуре -20°C . Перед экспериментом хромофоры разводили буфером до концентрации порядка 0,05 мкМ (поглощение суспензии хромофоров при 850 нм находилось в пределах 0,35–0,4 ед. о. п.). Для расчета числа хромофорных частиц в растворе использовали величину поглощения при 850 нм и соответствующий этой полосе коэффициент молярной экстинкции ССК LH2, равный $132\text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ [21], а также известное среднее число этих периферических комплексов в одном хромофоре, равное 63 [22].

Спектры поглощения регистрировали с помощью модифицированного спектрофотометра Hitachi-557 (Hitachi, Япония), а спектры флуоресценции – с использованием спектрофлуориметра Fluorolog-3 (Horiba-Jobin-Yvon, Франция). Возбуждение флуоресценции проводили при 430 нм. Кинетику затухания флуоресценции регистрировали методом время-коррелированного счета фотонов (time-correlated single-photon counting, TCSPC) при возбуждении светодиодами (NanoLED) с длиной волны 390 нм и длительностью импульса 0,8 нс.

В качестве источника катионного антисептика октенидина служил коммерческий препарат «Октенисепт» (Schulke & Maug, Германия), содержащий 0,1% дигидрохлорида октенидина и 2% феноксиэтанола. Предварительные эксперименты показали, что компонент препарата «Октенисепт» феноксиэтанол в эквимольных концентрациях сам по себе не влияет на спектральные свойства НАО и исследуемые параметры фотосинтетических мембран (данные не приведены).

В работе использовали флуоресцентный краситель НАО (Sigma-Aldrich, США). Непосредственно перед экспериментами с хроматофорами готовили исходный 30 мМ раствор НАО в этаноле, который затем доводили до значения концентрации красителя 5 мкМ натрий-фосфатным буфером. В отдельных экспериментах 30 мМ раствор НАО в этаноле хранили в течение месяца при температуре -80°C , а перед измерениями его разводили буфером до концентрации 5–20 мкМ.

Эксперименты повторяли три раза. Для обработки результатов было использовано либо стандартное приборное программное обеспечение, либо программа OriginPro 9.1 (Origin Lab., США).

Результаты

Влияние октенидина на собственно флуоресцентные свойства НАО в растворах. НАО представляет собой липофильный флуоресцентный краситель, содержащий азотистый гетероцикл производного акридина, связанный с нонилацильной цепью. В миллимолярных концентрациях

в этанольных и водно-метанольных растворах [23, 24] или микромолярных — в водном буфере с ЭДТА [25] — НАО имеет максимумы возбуждения флуоресценции при 495 нм и излучения — при 525 нм, характерные для акридинов в мономерной форме [26]. При концентрации в спиртовых растворах выше 100 мкМ акридиновые красители подвержены молекулярной агрегации — в первую очередь, с образованием Н-димеров. По сравнению с показателями мономерного акридина максимум возбуждения флуоресценции таких гомоагрегатов смещается на 22–25 нм в сторону более коротких длин волн, а максимум излучения — в «красную» область спектра [26]. По нашим наблюдениям, образование димеров НАО со сдвигом флуоресценции в «красную» область спектра может быть также результатом длительного хранения концентрированных растворов красителя в этаноле при низкой температуре (-80°C). При последующем их разведении буфером до концентрации 20 мкМ и в спектре поглощения, и в спектре флуоресценции полосы димера заметно увеличиваются (в спектре поглощения увеличена коротковолновая полоса при 470 нм и уменьшена полоса мономера при 495 нм, а в спектре флуоресценции соответственно уменьшена полоса мономера при 527 нм и увеличена полоса димера при 635 нм) (рис. 1, А и Б, кривые 1). При снижении концентрации НАО до 5–10 мкМ относительная амплитуда полос поглощения димера при 470 нм и флуоресценции при 635 нм падает, что говорит об уменьшении степени димеризации красителя (кривые 2 и 3).

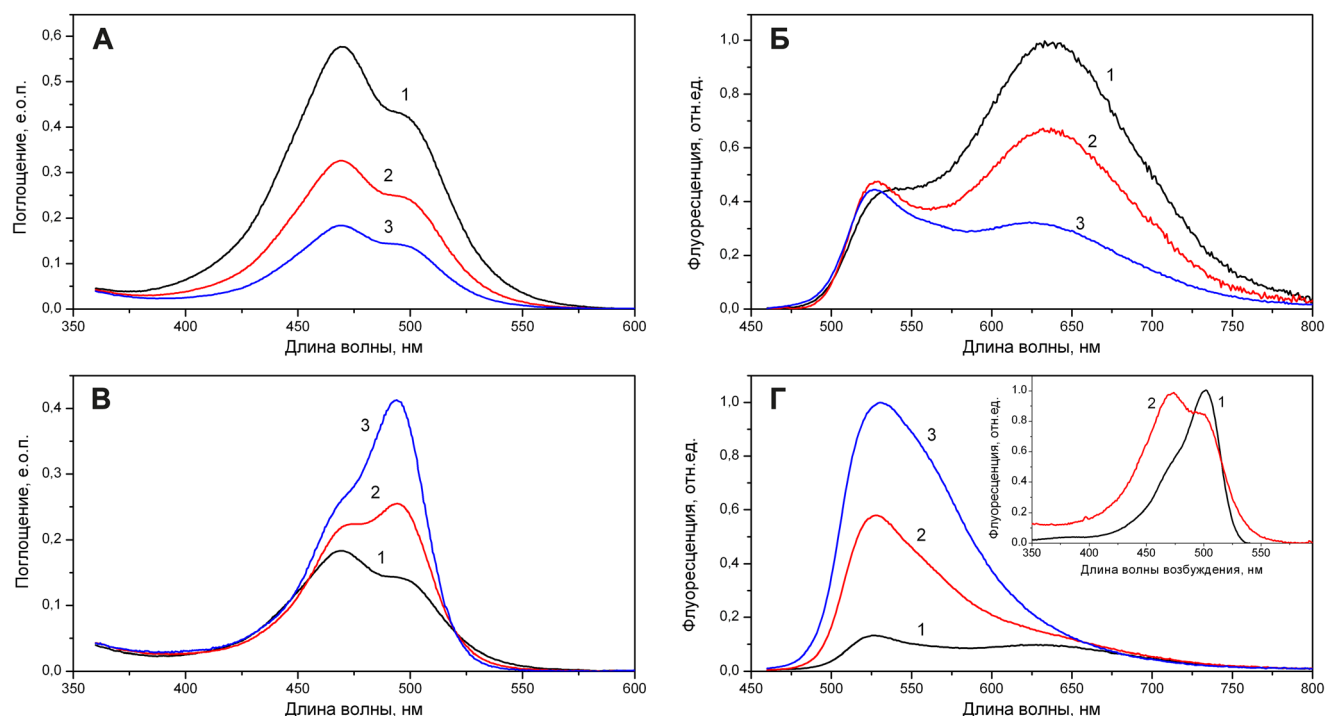


Рис. 1. Спектры поглощения (А) и флуоресценции (Б) НАО в 10 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,8) в концентрации 20, 10 и 5 мкМ (кривые 1, 2 и 3 соответственно), а также спектры поглощения (В) и флуоресценции (Г) раствора 5 мкМ НАО в контроле и в присутствии октенидина в концентрации 30 и 100 мкМ (кривые 1, 2 и 3 соответственно). На вставке рисунка Г показаны спектры возбуждения флуоресценции при 550 нм (1) и 650 нм (2) для раствора 5 мкМ НАО в контроле без октенидина.

В спектре возбуждения флуоресценции преимущественно димеров НАО (при 650 нм) преобладает коротковолновая полоса около 470 нм, а в спектре возбуждения флуоресценции преимущественно мономеров (550 нм) — полоса около 500 нм (рис. 1, вставка на панели Д). Вместе с тем, эти полосы, характерные для димеров НАО, исчезают после добавления октенидина (рис. 1, В и Г), а также детергента Тритон Х-100 в концентрации порядка 0,1% (данные не показаны). Следует отметить, что октенидин вызывает дезагрегацию димеров в растворе НАО, начиная с самых низких концентраций в несколько микромолей, а при его концентрациях 100 мкМ и выше спектры НАО (рис. 1, В и Г, кривые 3) характерны для полностью мономерного состояния красителя. На рис. 1 хорошо видно, что и экстинкция, и интенсивность флуоресценции при мономеризации НАО значительно увеличиваются. Таким образом, октенидин в растворе с НАО разрушает агрегаты красителя, обладающие «красной» флуоресценцией, проявляя свое хорошо известное свойство катионного детергента.

Влияние октенидина на флуоресценцию НАО в суспензии хроматофоров. На рис. 2А приведены спектры флуоресценции раствора 5 мкМ НАО с хроматофорами в концентрации ~0,05 мкМ (кривая 1) и ~0,025 мкМ (кривая 2). В первом случае на одну везикулу приходится примерно 100 молекул красителя, а во втором — около 200 молекул. Как видно из рисунка, при соотношении НАО:везикула 200:1 наблюдается более интенсивное свечение в «красной» области, что свидетельствует о более высокой степени димеризации НАО.

На рис. 2Б показана эволюция спектра флуоресценции суспензии ~0,05 мкМ хроматофоров, содержащей 5 мкМ НАО, при добавлении октенидина в возрастающей концентрации. Видно, что в диапазоне концентраций октенидина до 60 мкМ (кривые 2–5) наблюдается рост интенсивности «красного» свечения НАО в области 600–650 нм, что, по-видимому, указывает на формирование зон с более высокой плотностью красителя. Как мы показали ранее [12], при этих концентрациях антисептика происходит также нарушение эффективности переноса световой энергии от светособирающих комплексов LH2 к коровому комплексу LH1-RC в хроматофорах *R. sphaeroides*. Полосы флуоресценции около 700 нм и 780 нм (рис. 2Б) могут принадлежать продуктам деградации Бхл, образующимся в результате воздействия антисептика.

При концентрации октенидина выше 60 мкМ вклад «красного» свечения НАО падает (рис. 2Б, кривые 6–9). Отметим, что, независимо от последовательности добавления НАО и октенидина к хроматофорам, при низкой концентрации антисептика наблюдалась увеличенная «красная» флуоресценция НАО, а при высокой концентрации — ее практически не было.

Значения зависимости отношения интенсивности «красной» и «зеленой» флуоресценции НАО (Фл630/Фл530) от концентрации октенидина показаны на рис. 3. Кинетика затухания флуоресценции НАО в буфере (кривая 1), в суспензии НАО с хроматофорами при концентрации октенидина 50 мкМ (кривая 2) и 140 мкМ (кривая 3) приведены на вставке рис. 3. Длительность флуоресценции составляла $1,19 \pm 0,04$ нс, $4,06 \pm 0,05$ нс и $1,22 \pm 0,04$ нс соответственно. Как было показано ранее [27], время жизни флуоресценции димера НАО много больше, чем мономера. Из приведенных нами спектрально-кинетических данных следует, что при концентрациях октенидина около 100 мкМ и выше флуоресценция НАО в суспензии хроматофоров фактически приближается к флуоресценции свободного НАО в растворе буфера. Свидетельством разрушающего действия антисептика является и существенное увеличение интенсивности свечения продуктов деградации Бхл в области 700 нм (рис. 2Б), а также падение экстинкции полос поглощения при 800, 850 и 875 нм (данные не приводятся). Кроме того, ранее на препаратах фотосистемы 2 мы показали, что и длительность флуоресценции хлорофилла при этом увеличивается до 5 нс — значения, характерного для мономерного состояния хлорофилла в растворе [14].

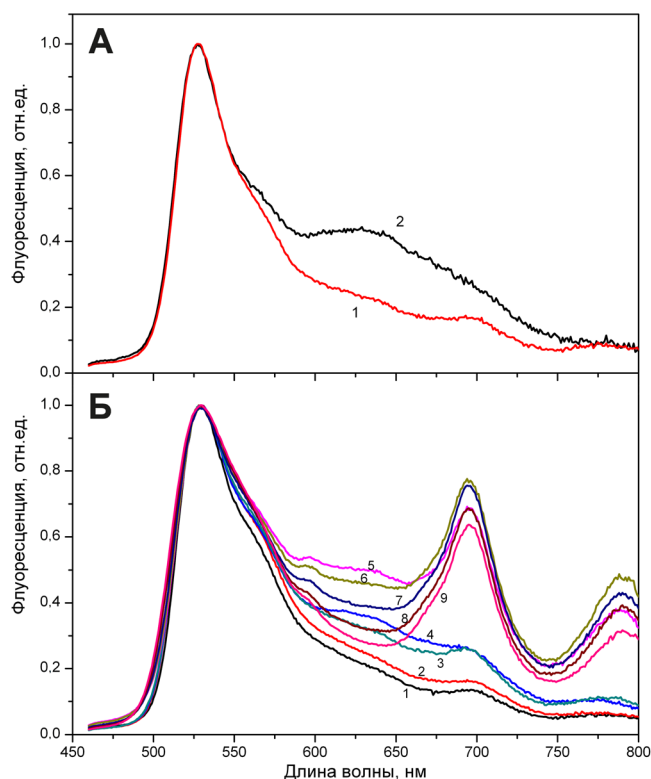


Рис. 2. Нормированные спектры флуоресценции НАО в присутствии хроматофоров без и с добавлением октенидина. **А** — Спектры флуоресценции 5 мкМ НАО в присутствии хроматофоров в концентрации ~0,05 мкМ (1) и 0,025 мкМ (2). **Б** — Спектры флуоресценции раствора 5 мкМ НАО в присутствии хроматофоров в концентрации ~0,05 мкМ в контроле (1) и в присутствии октенидина в концентрации 5, 20, 40, 50, 70, 90, 115 и 140 мкМ (кривые 2–9 соответственно).

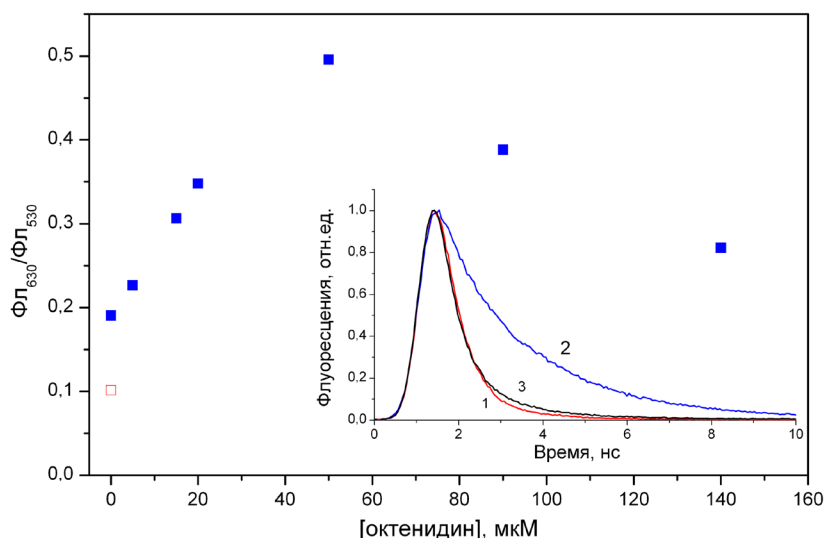


Рис. 3. Зависимость отношения интенсивности флуоресценции при 630 нм к таковой при 530 нм ($\text{Фл}_{630}/\text{Фл}_{530}$) для раствора 5 мкМ НАО в контроле без хромофоров и октенидина (открытый квадрат) и для раствора НАО с хромофорами от концентрации добавленного октенидина (закрытые квадраты). На вставке — кинетика затухания флуоресценции НАО при 530 нм в контроле (1), и в суспензии НАО с хромофорами после добавления октенидина в концентрации 50 мкМ (2) и 140 мкМ (3).

Обсуждение результатов

Выделяемые из бактерий *R. sphaeroides* хромофоры представляют собой замкнутые везикулярные частицы диаметром от 50 до 70 нм (в зависимости от условий выделения). Такая среднестатистическая частица включает в себя по имеющимся данным [22, 28] 63–67 периферических светособирающих комплексов LH2, 11 димерных LH1–RC–PufX и два мономерных LH1–RC–PufX коровых комплекса, 4 димерных комплекса цитохром-*bc1* и две молекулы АТФ-синтазы. Пигментный комплекс содержит ~2500 молекул БХл и ~1550 молекул каротиноидов. Эти молекулы связаны с 9-субъединичными гетеродимерными белковыми комплексами LH2, 14–15-субъединичными гетеродимерными белковыми комплексами LH1, 3-субъединичными белковыми комплексами РЦ. Кроме того, в составе хромофора находится подвижный липид-растворимый пул хинон/хинолов из примерно 900 молекул и порядка 16000 молекул фосфолипидов, формирующих мембранный бислой. Из этих фосфолипидов примерно половину составляют отрицательно заряженные кардиолипиды (6–13%) и фосфатидилглицерол (36–44%) [29]. Остальная масса липидов приходится на фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин.

Известно, что хотя НАО обладает наиболее высокой степенью сродства к кардиолипину, этот краситель способен связываться и с другими отрицательно заряженными липидами [27, 30]. Таким образом, положительно заряженные молекулы НАО потенциально могут вступать в зарядовые взаимодействия с по крайней мере половиной липидов мембранного бислоя. Связываясь с мембраной, НАО может формировать гомодиме-

ры [30, 31], а также сэндвич-подобные структуры, в которых две молекулы НАО располагаются с двух сторон полярной головки кардиолипидна [27]. При этом наблюдается сдвиг спектра флуоресценции красителя из «зеленой» в «красную» область. При низких концентрациях НАО связывается с мембраной в мономерной форме, а также существует в свободной форме в растворе.

Ранее [27] был исследован механизм возникновения «красного» свечения (640 нм) в смеси НАО в концентрации порядка 25 мкМ с везикулами из различных липидов. Методом флуоресцентной микроскопии с временным разрешением (fluorescence lifetime imaging, FLIM) было показано, что такая флуоресценция возникает в месте пограничного контакта двух везикул с молекулами НАО на их поверхностях. В другой работе [30] исследовалось изменение спектра флуоресценции НАО в постоянной концентрации 5 мкМ в Трис-буфере с возрастающей концентрацией липосом из разных липидов. Для всех липидов, кроме фосфатидилэтаноламина, было обнаружено, что при высоком содержании липосом наблюдается только «зеленая» флуоресценция, характерная для мономерного состояния красителя, тогда как при уменьшении числа липосом в суспензии, то есть увеличении числа молекул НАО на одну липосому, происходит сдвиг полосы флуоресценции НАО в сторону длинноволновой «красной» части спектра. Иными словами, чем выше плотность покрытия поверхности липосомы молекулами НАО, тем выше вероятность образования димеров НАО-НАО в месте контакта двух частиц. Как было показано микроскопически ранее [27], именно пограничное взаимодействие НАО из двух соседних слоев является причиной появления

«красной» флуоресценции. При этом квантовый выход флуоресценции димеров гораздо ниже, чем мономеров, что следует из значительного уменьшения интенсивности свечения НАО при уменьшении числа липосом (то есть росте отношения НАО/липид) в растворе. Таким образом, по ранее высказанному предположению [27], образование димеров НАО происходит в зоне контакта двух везикул, а «красная» полоса в спектре флуоресценции НАО, связанная с образованием его димеров, появляется только при достижении высокого отношения НАО/липосома. При наличии большого числа частиц с малым количеством сорбированного красителя образование пар НАО-НАО в результате взаимодействия липосом является редким событием. При более высокой плотности красителя на поверхности везикул в зоне контакта двух сферических частиц будет образовываться больше пар НАО-НАО. Наши данные с хроматофорами, которые также являются сферическими везикулярными частицами диаметром 50–70 нм, не противоречат этой гипотезе. Граничные взаимодействия между соседними молекулами НАО при агрегации хроматофорных везикул могут приводить к появлению «красного» свечения. Вероятность образования пар НАО-НАО в местах контакта соседних хроматофоров возрастает при высокой плотности молекул красителя на их поверхностях. Такие граничные взаимодействия в молекулах красителей, приводящие к «красному» сдвигу спектра флуоресценции, характерны и для многих других красителей [32]. Таким образом, наблюдаемый немонотонный ход интенсивности «красного» свечения НАО в присутствии октенидина можно описать следующим образом. При концентрациях октенидина до 60 мкМ происходит увеличение числа димеров НАО либо в зоне контактов между хроматофорами, либо непосредственно на поверхности хроматофора. Октенидин в более высокой концентрации вызывает разрушение образованных пар НАО-НАО за счет его поверхностно-активных свойств, что было показано нами для раствора НАО с исходно большим содержанием димеров.

Рассмотрим возможный механизм образования димеров НАО в мембране хроматофора в присутствии октенидина. Ранее мы показали, что все исследованные нами антисептики, которые оказывали влияние на функциональное состояние фотосинтетических мембран [12–15], имеют амфифильную природу с одновременным наличием в молекулах заряженных групп и гидрофобных участков. Но наибольшей «токсичностью» для фотосинтетических мембран обладал октенидин, в молекулах которого два положительно заряженных центра разделены 10-углеводородным линкером, также гидрофобные углеводородные «хвосты» располагаются по краям от этих зарядов. Такая структура, очевидно, способствует эффективным

зарядовым и гидрофобным взаимодействиям с биомембранами, нарушая их нормальную структурно-функциональную организацию. В вычислительных экспериментах нами показано, что при взаимодействии с модельным бислоем [33] молекула октенидина принимает форму скобы с погруженными в гидрофобную часть мембраны ацильными «хвостами». При этом центральная часть молекулы, несущая два положительно заряженных центра и гидрофобный линкер, располагается в области заряженных головок фосфолипидов. При внедрении в липидный бислой октенидин при соотношениях антисептик:липид от 1:60 до 1:6 вызывал уменьшение толщины мембраны, увеличивал площадь мембраны, приходящуюся на молекулу липида, снижал коэффициенты латеральной диффузии фосфатидилглицерола и фосфатидилэтаноламина и параметр порядка ацильных цепей липидов. Последнее согласуется с данными [34] о сильном разупорядывающем действии октенидина на упаковку липидных цепей. Мы показали, что при взаимодействии НАО с модельным бислоем, имитирующим плазматическую мембрану грамотрицательных бактерий, краситель существует в форме мономера или в комплексах с отрицательно заряженными липидами. Как и в случае с катионным антисептиком, внедрение ацильного «хвоста» НАО в липидный бислой приводило к уменьшению коэффициентов латеральной диффузии мембранных липидов. В этих модельных экспериментах было зафиксировано образование сэндвич-подобных комплексов НАО с кардиолипином [35]. Появление таких агрегатов должно проявляться стимуляцией «красного» свечения.

В фотосинтетической мембране, где половина липидов отрицательно заряжена, даже небольшие концентрации катионного антисептика октенидина потенциально могут приводить к существенной дезорганизации процессов переноса световой энергии между светособирающими комплексами, в том числе — в результате изменения латеральной диффузии липидов в бислой вследствие зарядовых взаимодействий. Нами было показано, что в области умеренных концентраций антисептика (до ~60 мкМ) происходит блокирование миграции энергии от периферийного LH2-комплекса к коровому комплексу LH1-RC [12]. В настоящей работе мы обнаружили, что действие октенидина на взаимодействие между светособирающими комплексами в такой низкой концентрации коррелирует с увеличением выхода «красной» флуоресценции НАО. При высоких концентрациях октенидина (порядка 100 мкМ и более) уже происходит нарушение пигмент-белковых и пигмент-пигментных взаимодействий, что хорошо видно по увеличению свечения продуктов деградации Бхл и росту количества свободного мономерного Бхл [12]. То есть нативная структура пигмент-белкового комплекса и липидной матри-

цы хроматофора разрушается. При этом молекулы НАО фактически теряют связь с отрицательно заряженными головками липидов и переходят в раствор. Поскольку октенидин, обладая свойствами детергента, способен разрушать димеры НАО в растворе, краситель в этих условиях находится преимущественно в мономерном состоянии с «зеленым» свечением. Таким образом, НАО фактически является флуоресцентным индикатором состояния фотосинтетической мембраны и изменений, которые происходят в ней под влиянием катионного антисептика.

Заключение

В настоящей работе хроматофоры пурпурных несерных бактерий *R. sphaeroides* использовались в качестве платформы, с которой взаимодействовали катионный антисептик октенидин и производное акридина НАО. Основные результаты иссле-

дований показали, что краситель НАО чувствителен к состоянию фотосинтетической мембраны, которое менялось под действием октенидина. Антисептик в низкой концентрации вызывает увеличение количества димеров НАО за счет облегчения проникновения красителя в липидный бислой, однако при высоких концентрациях он разрушает нативную структуру всего пигмент-белкового комплекса, что сопровождается мономеризацией НАО. Последний процесс коррелирует с образованием продуктов деградации пигментного аппарата — бактериофеофитина и мономерного Бхл [12].

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032500058-7. Работы проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kampf G. Biocidal agents used for disinfection can enhance antibiotic resistance in gram-negative species. *Antibiotics*. 2018;7(4):e110.
2. Hübner N.O., Siebert J., Kramer A. Octenidine dihydrochloride, a modern antiseptic for skin, mucous membranes and wounds. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2010;23(5):244–258.
3. Gilbert P., Moore L.E. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J. Appl. Microbiol.* 2005;99(4):703–715.
4. Boyce J.M. Quaternary ammonium disinfectants and antiseptics: tolerance, resistance and potential impact on antibiotic resistance. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 2023;12(1):e32.
5. Kodama H., Hashimoto T., Tsuruoka M., Kido Y., Uyeda M., Shibata M. Microbial degradation of disinfectants. IV. Treatment by activated sludge of chlorhexidine. *Eiseikagaku*. 1988;34:408–413.
6. Tezel U., Pavlostathis S.G. Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2015;33:296–304.
7. Keerthisinghe T.P., Nguyen L.N., Kwon E.E., Oh S. Antiseptic chlorhexidine in activated sludge: Biosorption, antimicrobial susceptibility, and alteration of community structure. *J. Environ. Manage.* 2019;237:629–635.
8. Östman M., Lindberg R.H., Fick J., Björn E., Tysklind M. Screening of biocides, metals and antibiotics in Swedish sewage sludge and wastewater. *Water Res.* 2017;115:318–328.
9. Linhartová L., Michalíková K., Šrédlová K., Cajthaml T. Biodegradability of dental care antimicrobial agents chlorhexidine and octenidine by ligninolytic fungi. *Molecules*. 2020;25(2):e400.
10. Lawrence J.R., Zhu B., Swerhone G.D.W., Topp E., Roy J., Wassenaar L.I., Rema T., Korber D.R. Community-level assessment of the effects of the broad-spectrum antimicrobial chlorhexidine on the outcome of river microbial biofilm development. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008;74(11):3541–3550.
11. Li X., Brownawell B. J. Quaternary ammonium compounds in urban estuarine sediment environments — A class of contaminants in need of increased attention? *Environ. Sci. Technol.* 2010;44(19):7561–7568.
12. Strakhovskaya M.G., Lukashev E.P., Korvatovskiy B.N., Kholina E.G., Seifullina N.Kh., Knox P.P., Paschenko V.Z. The effect of some antiseptic drugs on the energy transfer in chromatophore photosynthetic membranes of purple nonsulfur bacteria *Rhodobacter sphaeroides*. *Photosynth. Res.* 2021;147(1):197–209.
13. Knox P.P., Lukashev E.P., Korvatovskiy B.N., Strakhovskaya M.G., Makhneva Z.K., Bol'shakov M.A., Paschenko V.Z. Disproportionate effect of cationic antiseptics on the quantum yield and fluorescence lifetime of bacteriochlorophyll molecules in the LH1RC complex of *R. rubrum* chromatophores. *Photosynth. Res.* 2022;153(1):103–112.
14. Paschenko V.Z., Lukashev E.P., Mamedov M.D., Korvatovskiy B.N., Knox P.P. Influence of the antiseptic octenidine on spectral characteristics and energy migration processes in photosystem II core complexes. *Photosynth. Res.* 2023;155(1):93–105.
15. Paschenko V.Z., Lukashev E.P., Mamedov M.D., Gvozdev D.A., Knox P.P. Effect of cationic antiseptics on fluorescent characteristics and electron transfer in cyanobacterial photosystem I complexes. *Photosynth. Res.* 2023;159(2-3):241–251.
16. Liang C.-M., Hung C.-H., Hsu S.-C., Yeh I.-C. Purple nonsulfur bacteria diversity in activated sludge and its potential phosphorus-accumulating ability under different cultivation conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009;86(2):709–719.
17. Inmaculada M., Fernandez G., Ceccarelli D., Muscatello U. Use of the fluorescent dye 10-N-nonyl acridine orange in quantitative and location assays of cardiolipin: a study on different experimental models. *Anal. Biochem.* 2004;328(2):174–180.
18. Kaewsuya P., Danielson N.D., Ekhterae D. Fluorescent determination of cardiolipin using 10-N-nonyl acridine orange. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007;387(8):2775–2782.

19. Mohr B., Shmilovich K., Kleinwachter I.S., Schneide D., Ferguson A.L., Bereau T. Data-driven discovery of cardiolipin-selective small molecules by computational active learning. *Chem. Sci.* 2022;13(16):4498–4511.
20. Knox P.P., Lukashev E.P., Korvatovskii B.N., Seifullina N.K., Goryachev S.N., Allakhverdiev E.S., Paschenko V.Z. Effect of dipyrindamole on membrane energization and energy transfer in chromatophores of *Rba. sphaeroides*. *Biochemistry (Mosc.)*. 2022;87(10):1138–1148.
21. Clayton R.K., Clayton B. J. B850 pigment-protein complex of *Rhodospseudomonas sphaeroides*: Extinction coefficients, circular dichroism, and the reversible binding of bacteriochlorophyll. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 1981;78(9):5583–5587.
22. Niederman R.A. Photosynthesis in the Purple Bacteria. *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes*. Ed. P.C. Hallenbeck. Springer Intern. Publ. AG; 2017:193–224.
23. Gallet P.F., Maftah A., Petit J.-M., Denis-Gay M., Julien R. Direct cardiolipin assay in yeast using the red fluorescence emission of 10-N-nonyl acridine orange. *Eur. J. Biochem.* 1995;228(1):113–119.
24. Kaewsuya P., Danielson N. D., Ekhterae D. Fluorescent determination of cardiolipin using 10-N-nonyl acridine orange. *Analyt. Bioanalyt. Chem.* 2007;387(8):2775–2782.
25. Petit J.M., Huet O., Gallet P.F., Maftah A., Ratinaud M.H., Julien R. Direct analysis and significance of cardiolipin distribution in mitochondrial inner membranes. *Eur. J. Biochem.* 1994;220(3):871–879.
26. Shenderovich I.G. The partner does matter: The structure of heteroaggregates of acridine orange in water. *Molecules*. 2019;24(15):e2816.
27. Almendro-Vedia V.G., García C., Ahijado-Guzmán R., de la Fuente-Herreruela D., Muñoz-Úbeda M., Natale P., Viñas M.H., Albuquerque R.Q., Guerrero-Martínez A., Monroy F., Pilar Lillo M., López-Montero. Supramolecular zippers elicit interbilayer adhesion of membranes producing cell death. *Biochim. Biophys. Acta. General subjects*. 2018;1862(12):2824–2834.
28. Cartron M.L., Olsen J.D., Sener M., Jackson P.J., Brindley A.A., Qian P., Dickman M.J., Leggett G.J., Schulten K., Hunter C.N. Integration of energy and electron transfer processes in the photosynthetic membrane of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochim. Biophys. Acta*. 2014;1837(10):1769–1780.
29. Nagatsuma S., Gotou K., Yamashita T., Yu L.-J., Shen J.-R., Madigan M.T., Kimura Y., Wang-Otomo Z.-Y. Phospholipid distributions in purple phototrophic bacteria and LH1-RC core complexes. *Biochim. Biophys. Acta*. 2019;1860(6):461–468.
30. Oliver P.M., Crooks J.A., Leidl M., Yoon E.J., Saghatelian A., Weibel D.B. Localization of anionic phospholipids in *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* 2014;196(19):3386–3398.
31. Mileyskovskaya E., Dowhan W., Birke R.L., Zheng D., Lutterodt L., Haines T.H. Cardiolipin binds nonyl acridine orange by aggregating the dye at exposed hydrophobic domains on bilayer surfaces. *FEBS Lett.* 2001;507(2):187–190.
32. Gadde S., Batchelor E.K., Weiss J.P., Ling Y., Kaifer A.E. Control of H- and J-aggregate formation via host-guest complexation using cucurbituril hosts. *J. Am. Chem. Soc.* 2008;130(50):17114–17119.
33. Kholina E.G., Kovalenko I.B., Bozdaganyan M.E., Strakhovskaya M.G., Orekhov P.S. Cationic antiseptics facilitate pore formation in model bacterial membranes. *J. Phys. Chem. B*. 2020;124(39):8593–8600.
34. Malanovic N., Ön A., Pabst G., Zellner A., Lohner K. Octenidine: Novel insights into the detailed killing mechanism of Gram-negative bacteria at a cellular and molecular level. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2020;56(5):e106146.
35. Kholina E., Kovalenko I., Rubin A., Strakhovskaya M. Insights into the formation of intermolecular complexes of fluorescent probe 10-N-nonyl acridine orange with cardiolipin and phosphatidylglycerol in bacterial plasma membrane by molecular modeling. *Molecules*. 2023;28(4):e1929.

Поступила в редакцию 10.10.2023

После доработки 05.03.2024

Принята в печать 21.03.2024

RESEARCH ARTICLE

Dye 10-N-nonyl acridine orange as a fluorescent indicator of the action of the antiseptic octenidine on the membranes of *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores

E.P. Lukashev¹ , P.P. Knox¹, M.G. Strakhovskaya^{2, *} , V.Z. Paschenko¹

¹*Biophysics Department and* ²*Synthetic Biology Department, Biology Faculty, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia*

*e-mail: maristra@yandex.ru

Increasing volumes of produced antiseptics and disinfectants, which are widely used in medicine, veterinary medicine, the food industry and everyday life, can create a serious environmental problem after use. Previously, under the influence of micromolar concentrations of a number of antiseptics, we identified disturbances in the functioning of photosynthetic membranes and phototransforming pigment-protein complexes isolated from them in various representatives of photosynthetic organisms. In this work, to determine the sensitivity of photosynthetic membranes to the action of the cationic antiseptic octenidine, we used

chromatophores of the purple nonsulfur bacteria *Rhodobacter sphaeroides*, labeled with the fluorescent dye 10-N-nonylacridine orange (NAO). It was shown that the binding of NAO to chromatophores is accompanied by a shift in the dye emission maximum from 525 to 640 nm. The “red” fluorescence of NAO associated with chromatophores turned out to be sensitive to the effect of increasing concentrations of octenidine on photosynthetic membranes. We have found antiseptic concentrations which led to the degradation of chromatophore structures and change in the NAO aggregative state. It can be detected by an increase of “green” fluorescence in the emission spectra of the dye. The properties of NAO as a fluorescent indicator of the functional state of photosynthetic membranes and possible changes that can occur in such systems under the influence of a cationic antiseptic are discussed.

Keywords: *purple non-sulfur bacteria, chromatophores, photosynthetic membranes, fluorescence, 10-N-nonyl acridine orange, antiseptic octenidine*

Funding: The study was carried out within the framework of the scientific project of the state assignment of Moscow State University No. 121032500058-7.

Сведения об авторах

Лукашев Евгений Павлович — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-12-38; e-mail: lukashev@biophys.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6853-6122>

Нокс Петр Петрович — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-12-38; e-mail: knox@biophys.msu.ru

Страховская Марина Глебовна — докт. биол. наук, доц. кафедры синтетической биологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-00-06; e-mail: maristra@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4571-0431>

Пащенко Владимир Захарович — докт. физ.-мат. наук, рук. сектора кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-48-45; e-mail: vz.paschenko@gmail.com