

## ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОСПЕКТРОФЛУОРИМЕТРА / МИКРОСПЕКТРОФОТОМЕТРА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОВЕРХНОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

Рощина В.В.<sup>1</sup>, Куньев А.Р.<sup>1</sup>, Фатерыга В.В.<sup>2</sup>, Шовкун М.М.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН

ул. Институтская, 3, г. Пущино, Московская обл., 142290, РФ; e-mail: roshchinavic@mail.ru

<sup>2</sup> Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского-природный заповедник РАН, филиал Института биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН  
с. Курортное, г. Феодосия, 298188, РФ

<sup>3</sup> Приокско-Террасный государственный природный биосферный заповедник  
Данки, Серпуховский городской округ, Московская обл., 142200, РФ  
Поступила в редакцию 18.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0600

**Аннотация.** С помощью микроспектрофлуориметра/микроспектрофотометра МСФ-15 (ЛОМО, Санкт-Петербург) получены спектры флуоресценции и поглощения интактных клеток растений можжевельника высокого *Juniperus excelsa*, зопника клубненосного *Phlomis tuberosa*. белокопытника ложного *Petasites spurius*, василька шероховатого *Centaurea scabiosa* и купыря лесного *Anthriscus sylvestris*. Полученные спектры собственной флуоресценции и поглощения дали возможность тестировать состав соединений снаружи клеточной стенки. Эта аппаратура позволила обнаружить на поверхности интактных клеток присутствие секретов, включающих вторичные метаболиты с максимумами флуоресценции в области 530-550 нм, характерными для фенольных соединений. В спектрах поглощения листьев обнаружены максимумы в области 580-620 нм, что свойственно голубым пигментам азуленам. Присутствие азуленов на поверхности клеток подтверждено кратковременной экстракцией этих пигментов этанолом или ацетоном. Подобный методический подход рекомендован для экспресс-анализа интактных поверхностей растительных клеток.

**Ключевые слова:** азулены, поглощение, секреторные продукты, фенолы. флуоресценция, экскреты.

Памяти Валерия Николаевича Карнаухова

### ВВЕДЕНИЕ

Изучение поверхности растений до сих пор не являлось отдельной задачей биофизических работ. Между тем, это важно для понимания механизмов защиты растительной клетки, поскольку на ее поверхности могут присутствовать, а также выделяться в виде экскретов разнообразные соединения. Эта проблема могла быть рассмотрена с применением техники микроспектрофлуориметрии и микроспектрофотометрии [1,2]. Задачей нашей работы было изучить с помощью такой аппаратуры поверхность клеток различных видов. Основное внимание предполагалось сосредоточить на объектах, обладающих серебристой или голубой окраской и у которых могли быть голубые пигменты азулены, что ранее связывали с устойчивостью к озону [3].

### МЕТОДЫ

**Объекты.** В качестве объектов исследований были выбраны виды охраняемых и/или лекарственных растений: листья и шишкоягоды можжевельника высокого *Juniperus excelsa* Vieb. (сем. Cupressaceae) из Карадагского заповедника (собраны в октябре 2022 г.), Феодосия, Крым, листья купыря лесного *Anthriscus sylvestris* Hoffm. (сем. Umbelliferae), собранные в мае-июне 2022-2023 годов в государственном заказнике "Степной" г.Пущино, и произрастающих также в Приокско-Террасном заповеднике, в том числе из списка растений Красной книги Подмосковья, зопника клубненосного *Phlomis tuberosa* L. (сем. Labiatae), белокопытника ложного *Petasites spurius* (Reitz.) Reichenb. (сем. Asteraceae), василька шероховатого *Centaurea scabiosa* L. (сем. Asteraceae) L. Общий вид исследованных поверхностей представлен на рис.1. Для сравнения были выбраны и растения, известные присутствием азуленов [4], полынь горькая *Artemisia absinthium* L. и тысячелистник обыкновенный *Achillea millefolium* L. (сем. Asteraceae).

**Спектральные методы.** Поглощение и собственную флуоресценцию клеток измеряли непосредственно на предметных стеклах с помощью микроспектрофотометра/ микроспектрофлуориметра МСФ-15 (ЛОМО, Санкт-Петербург, Россия). Спектры поглощения наших объектов представлены как первая производная кривых по Золотареву [5]. Фотографировали образцы с помощью люминесцентного микроскопа *Leica DM 6000 B*, и микроспектрофотометра/микроспектрофлуориметра МСФ-15 с камерой *Levenhuk M300 Base* (США). Спектры поглощения и флуоресценции экстрактов 100% ацетоном или 95 % этанолом из клеток (1:10 вес/объем в течение от 10 мин согласно работе [3]) в 1- 0,5 см-кюветах или на бумажных хроматограммах регистрировали с помощью вышеупомянутых спектрофотометров и спектрофлуориметра. с помощью спектрофотометров *Specord M-40* (Германия), *Unicam Helios-epsilon* (США).



**Рисунок 1.** Общий вид поверхностей объектов с серебристой и голубой окраской.

- (а) – хвоя и шишкоягоды можжевельника высокого в сентябре-октябре,  
 (б) и (в) – листья белокопытника ложного и зопника клубненосного в мае,  
 (г) – листья купыря лесного в мае, (д) – листья василька шероховатого в мае-июне

**Экстракция и хроматография азуленов.** Для обнаружения азуленов получали экстракты-смывы с интактной поверхности 100% ацетоном или 95 % этанолом из клеток (1:10 вес/объем в течение 10 мин) [3]. Экстракты хроматографировали на бумаге Ватман № 1 без или после пропитки вазелином или на тонкослойных силикагелевых пластинах Силуфола, как это было описано ранее для пыльцы ряда семенных растений и микроспор хвоща полевого [3]. Были зарегистрированы их спектры поглощения и флуоресценции для сравнения с данными, полученными на интактных клетках. Средняя погрешность эксперимента в три-четыре повторения была рассчитана для каждого варианта и контроля соответственно. Концентрацию азуленов ( $A$ , в молях, молекулярная масса азулена 128,18) оценивали в растворах этанола или ацетона по формуле:

$$A = D_{580} / \epsilon \times l,$$

где  $D_{580}$  – оптическая плотность при 580 нм;  $\epsilon$  – молярный коэффициент экстинкции  $328 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;  $l$  – толщина слоя жидкости в кювете.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Поверхность клетки является первичным сенсором любого внешнего сигнала, а также может быть защитным барьером, если она включает в себя соответствующие компоненты, защищающие клетку от любых повреждений. С помощью микроскопии проходящего света и флуоресцентной микроскопии, включая также микроспектрофлуориметрию и микроспектрофотометрию, исследовали поверхность наших видов, получив их фотографические изображения, спектры флуоресценции и поглощения.

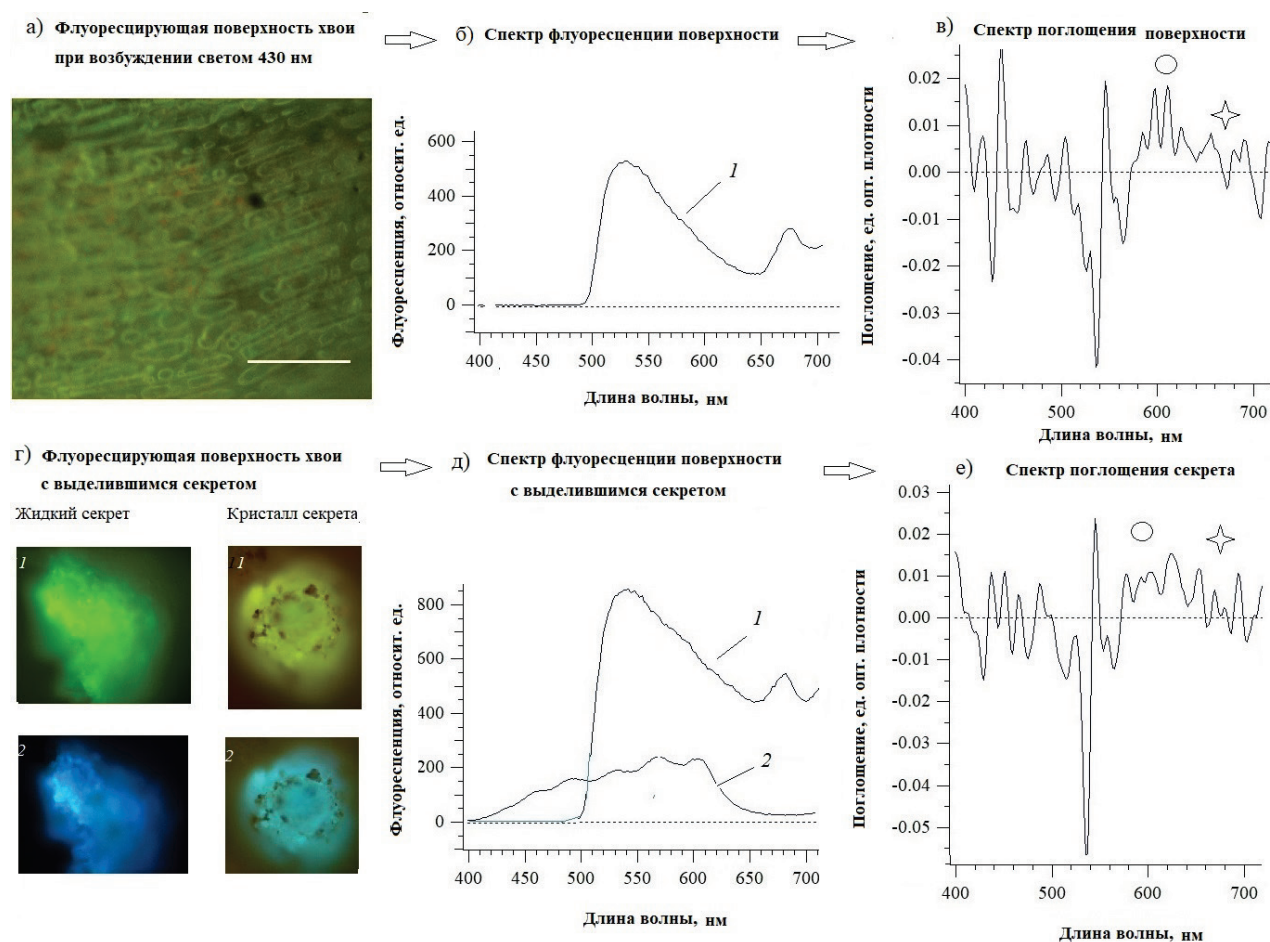


Как видно на рисунке 1, эти образцы имели голубоватый и синий цвет, что предполагает присутствие синих пигментов – сесквитерпеновых лактонов, таких как азулены. Окраска не принадлежала антоциану, потому что она не изменялась при сдвигах pH, когда мы действовали кислотой или щелочью.

В проходящем свете люминесцентного микроскопа исследуемые поверхности выглядели как темно- или светло-зеленая картинка, но при возбуждении зеленым или синим светом клетки флуоресцировали. Изображения различались в зависимости от наличия секрета (смолы) или его отсутствия, как например у можжевельника (рис. 2). Если поверхность хвои была свободна от смолы (а), она флуоресцировала неярким зеленым светом. Напротив, секрет, выделяемый на поверхность хвои (з), светится ярко зелено-желтым или синим цветом при возбуждении светом 430 нм (1) или 360-380 нм (2), соответственно. Кристаллы смолы флуоресцировали подобно жидким секретам (з). Поверхность без секрета светила в зеленой области с максимумом 530 нм при возбуждении 430 нм, что свойственно некоторым флавоноидам [6]. Жидкий и кристаллический секреты в этих условиях имели более высокую интенсивность свечения в максимуме 540-550 нм (рис. 1д). При этом небольшой максимум 680 нм указывал на свечение хлорофилла. Возбуждение ультрафиолетовым светом 360-380 нм в варианте без секрета не приводило к свечению в синей области спектра, однако сам секрет люминесцировал с заметной интенсивностью (рис. 2г, 2; рис. 2 д, 2). Более того, в спектре флуоресценции секрета отмечали максимумы 480-490, 560 и 600 нм, что могло относиться соответственно к смеси различных фенолов с терпеноидами или свечению флавоноидов типа рутин [6].

Для определения максимумов в спектроскопии отражения в микроспектрофлуориметре/микроспектрофотометре существует вариант дифференцирования для идентификации максимумов в спектрах поглощения [5]. Первая производная спектра внешнего отражения для полос низкой интенсивности позволяет непосредственно определить положение максимума полосы поглощения (рис. 2).

На рисунке 2 приведен пример спектров поглощения для вечнозеленого вида можжевельника высокого. У него в спектрах поглощения поверхностей хвои и шишкоягод (верхние участки графиков) отчетливо видны максимумы в области 580-615 нм, свойственные азуленам. Верхние участки спектров поглощения дают информацию о составе компонентов поверхности, в дальнейшем будем рассматривать именно их. Так в спектрах



**Рисунок 2.** Анализ спектральных характеристик поверхности образцов на примере хвои можжевельника высокого. (а) – вид флуоресцирующей поверхности без секрета и (г) с выделившимся жидким и кристаллизованным секретом под люминесцентным микроскопом, где общий масштаб 100 мкм; (б) спектры собственной флуоресценции при возбуждении светом 430 нм (1) или 360-380 нм (2). (в) и (е) – спектры поглощения по методу Золотарева [5], где круги – максимумы, свойственные азуленам 580-615 нм, звездочки – максимумы 660-666 нм, относящиеся к хлорофиллу

поглощения можжевельника (рис. 2в, рис. 2е) видны максимумы в области 580-615 нм, свойственные азуленам, и 660-666 нм, характерные для хлорофилла [3].

Для тестирования присутствия азуленов на поверхности других исследованных видов изучали спектры поглощения также, как и у можжевельника высокого (рис. 3). Заметим, что у данных растений серебристая или голубая окраска может исчезать после мая-июня, когда она наиболее заметна. Максимумы в области 580-620 нм обнаружены у всех исследованных травянистых видов. Есть различия в спектрах нижней и верхней поверхностей листьев. Мы сравнили данные с такими растениями, как полынь горькая и тысячелистник обыкновенный, где установлено присутствие азуленов в продуктах их дистилляции как фармакологического сырья [4]. Для нашей аппаратуры значимыми считаются максимумы порядка 0,05 единиц оптической плотности, как у полыни горькой. Видно, что максимумов в исследуемой области может быть несколько, что, по-видимому, характерно для различных по структуре голубых пигментов [4]. Максимальная интенсивность в этой области отмечена для полыни горькой – около 0,3 единиц оптической плотности, что хорошо согласуется с известным литературным источником [4], опирающимся на исследования содержания азуленов в продуктах дистилляции этого вида. Значимые интенсивности максимумов в области азуленов (равны или больше 0,05 единиц оптической плотности) обнаружены у всех исследованных растений, причем иногда они больше, чем максимумы хлорофилла, находящегося уже внутри клеток. Видимо, заметное количество синих пигментов находится на поверхности клеточной стенки, например в кутикуле.

Для подтверждения данных о присутствии азуленов на поверхности клеток, полученных спектральным методом, были сделаны их определения в экстрактах-смывах этанолом и ацетоном с интактной поверхности листьев в кратковременной 10 минутной экстракции. Как показано в таблице 1, наибольшее количество азуленов свойственно зопнику клубненосному, что согласуется с его синеватой окраской на снимке интактных листьев (рис. 1). В меньшем количестве данные пигменты видны и у белокопытника ложного (возможно связано с опушением и большой сочностью-оводненностью листьев). По данным таблицы 1, в хвое можжевельника высокая концентрация азуленов выше, чем в шишко-ягодах при расчете на 1 г свежей массы. Шишкоягоды, собираемые в осенне-зимний период, содержат больше влаги, чем хвоя. Если сравнить с данными, полученными ранее для древесных растений [3,7], то количество азуленов у можжевельника высокого значительно выше, чем у таких хвойных серебристых видов, как кедр атласский, серебристая ель, сосна мелкоцветковая, но близко к их содержанию на поверхности у эвкалипта пепельного, облепихи крушиновидной, лоха серебристого [7]. Однако у травянистых растений, таких как клевер луговой и клевер белый с постоянной синеватой окраской листьев

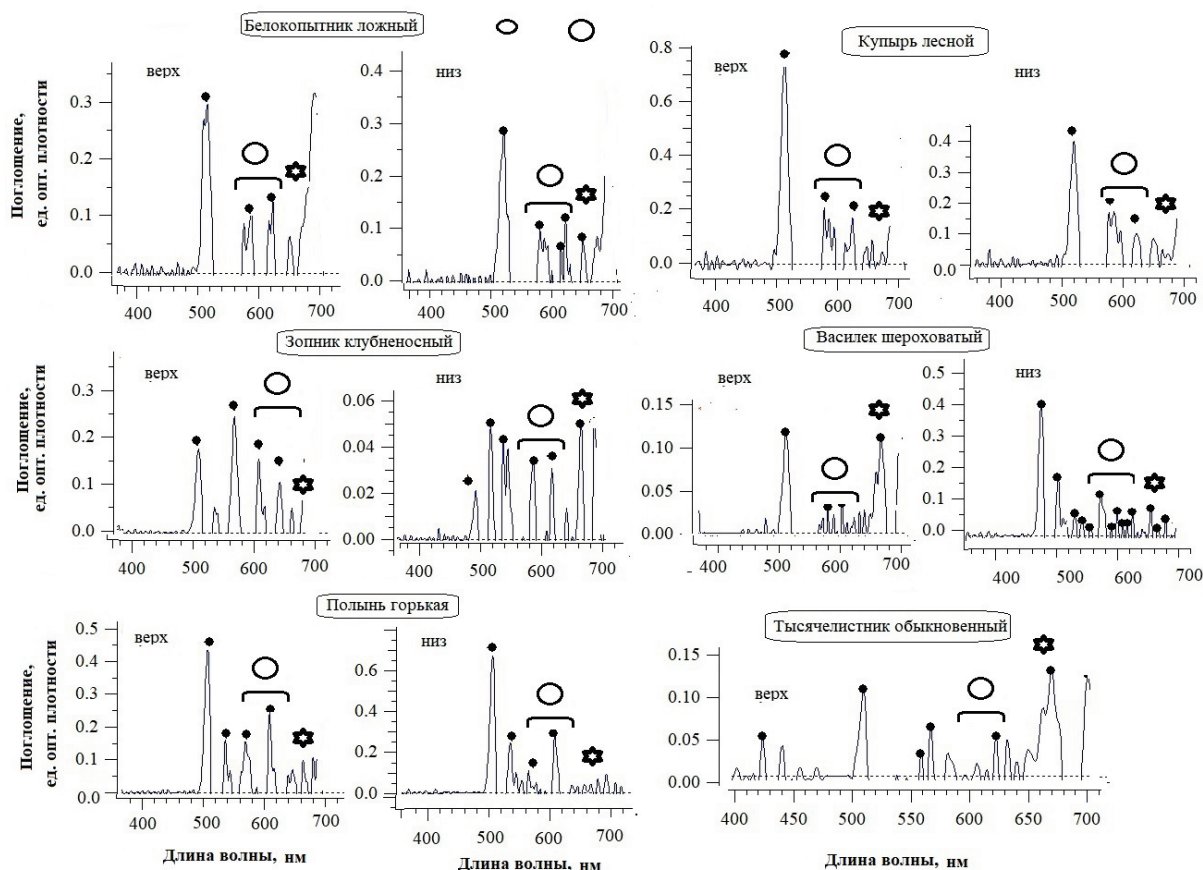


Рисунок 3. Спектры поглощения поверхностей травянистых растений. Кружки– максимумы, свойственные азуленам 580-615 нм, звездочки – максимумы 660-666 нм, характерные для хлорофилла

Таблица 1. Присутствие азуленов в 10 минутных экстрактах -смывах ряда растений

Вид растения	Часть растения	Азулены, мг/г сырой массы
Белокопытник ложный	Лист	0,367±0,11
Зопник клубненосный	Лист	6,45 ±0,20
Можжевельник высокий	Хвоя	1,76±0,30
Можжевельник высокий	Шишкочагоды	1,46±0,20

количество азуленов близко к тому, что наблюдается у белокопытника ложного [7]. Отметим, что голубая окраска видна лишь в мае-июне у исследованных травянистых видов зопника клубненосного и белокопытника ложного, а позднее она исчезает, поскольку интенсивность ультрафиолетовой радиации ослабевает к этому времени.

Использованная аппаратура позволила судить о присутствии голубых пигментов азуленов на поверхности у ряда растений не только с видимой серебристой или голубой окраской как у можжевельника, но и у объектов, где такая окраска видна, в основном, в весенний сезон. В отличие от использованных травянистых видов у можжевельника высокого голубая окраска хвои постоянна, что определяется высоким уровнем ультрафиолетовой радиации в горной местности Крымского заповедника. Полагают, что азулены представляют собой оптический фильтр для ультрафиолета и озона [3,7]. Тест на присутствие азуленов может быть полезен в экологическом мониторинге, поскольку в определенной мере характеризует устойчивость вида к озону и повышенной ультрафиолетовой инсоляции.

Азулены растений известны как сильные антиоксиданты, их применение описано подробно в фармацевтике и медицине, а также в аналитических технологиях [8,9]. Использование в данной работе микроспектрофлуориметра/микроспектрофотометра позволяет тестировать присутствие азуленов у растений, чтобы предварительно оценить потенциал перспективных видов как фармакологического сырья, поскольку лечебное действие азуленов довольно хорошо известно [8].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Спектральные методы, такие как микроспектрофлуориметрия и микроспектрофотометрия, позволяют изучать клеточные поверхности растений и анализировать возможные компоненты из собранного в минимальных количествах материала. Особенно это важно для растений, произрастающих в заповедниках и охраняемых заказниках, где встречаются краснокнижные растения. Флуоресценция в видимой области спектра часто выявляет присутствие секреторных продуктов, экскретируемых на поверхность из клетки и содержащих защитные соединения, такие как фенолы и терпеноиды. Спектральные методы предварительного тестирования на наличие азуленов по спектрам поглощения могут быть рекомендованы в лабораторной практике и не требуют большого количества материала для анализа. Они могут быть применены для оценки устойчивости к негативному воздействию окружающей среды (УФ-облучение, озон и т.д.) и качества видов, перспективных в качестве фармакологического сырья.

### Список литературы / References:

1. Karnaukhov V.N., Yashin V.A., Kulakov V.I., Vershinin V.M., Dudarev V.V. Apparatus for investigation of fluorescence characteristics of microscopic objects. *USA Patent*, 1982, vol. 354, no. 4, iss. 114, pp. 1-14.
2. Karnaukhova N.A., Sergievich L.A., Karnaukhov V.N. Application of microspectral analysis to study intracellular metabolism in single cells and cell systems. *Natural Science*, 2010, vol. 2, no. 5, pp. 444-449
3. Рощина В.В., Яшин В.А., Куньев А.Р., Солтани Г.А., Призова Н.К., Хайбулаева Л.М. Присутствие азуленов на поверхности растительных клеток как тест на чувствительность к озону. *Биологические мембраны*, 2022, т. 39, № 1, с. 54-62, doi: 10.1134/S1990747822010081 [Roshchina V.V., Yashin V.A., Kuniyev A.R., Soltani G.A., Prizova N.K., Khaibulaeva L.M. The presence of azulenes on the surface of plant cells as a test for sensitivity to ozone. *Biological Membranes*, 2022, vol. 39, no. 1, pp. 54-62 (In Russ.)].
4. Коновалов Д.А. Природные азулены. *Растительные ресурсы*, 1995, т. 31, № 1, с.101-130 [Konovalov D.A. Natural azulenes. *Plant Resources*, 1995, vol. 31, no. 1, pp.101-130 (In Russ.)].
5. Золотарев В.М. Применение дифференцирования в спектроскопии отражения. *Оптика и Спектроскопия*, 2012, т. 112, № 1, с. 150-154 [Zolotarev V.M. Application of differentiation in reflection spectroscopy. *Optics and Spectroscopy*, 2012, vol. 112, no. 1, pp. 150-154 (In Russ.)].
6. Roshchina V.V. *Fluorescing World of Plant Secreting Cells*. Enfield, Jersey, Plymouth: Science Publisher, 2008, 338 p.
7. Рощина В.В., Призова Н.К., Хайбулаева Л.М. Азулены листовой поверхности как защитный оптический фильтр. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2022, т. 7, № 1, с. 36-39, doi: 10.29039/rusjbpс.2022.0480 [Roshchina V.V., Prizova N.K., Khaibulaeva L.M. Azulenes of the leaf surface as a protective optical filter. *Russian journal of biological physics and chemistry*, 2022, vol. 7, no. 1, pp. 36-39 (In Russ.)].
8. Bakun P., Czarzynska-Goslinska, B., Goslinski T., Lijewski S. In vitro and in vivo biological activities of azulene derivatives with potential applications in medicine. *Med Chem Res*, 2021, vol. 30, pp. 834-846, doi: 10.1007/s00044-021-02701-0.

9. Murfin L.C., Lewis S.E. Azulene - a Bright core fore sensing and imaging. *Molecules*, 2021, vol. 26, no. 2, pp. 353-362, doi: 10.3390/molecules26020353.

**APPLICATION OF MICROSPECTROFLUORIMETER/MICROSPECTROPHOTOMETER FOR THE STUDY OF THE SURFACE OF PLANT CELLS**

**Roshchina V.V.<sup>1</sup>, Kunyev A.R.<sup>1</sup>, Fateryga V.V.<sup>2</sup>, Shovkun M.M.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Cell Biophysics RAS, FIC PNBC RAS

*Institutskaya str., 3, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia; e-mail: roshchinavic@mail.ru*

<sup>2</sup> Karadag Research Station T.I. Vyazemsky named -Nature Reserve of the Russian Academy of Sciences, Branch of the A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of the Russian Academy of Sciences

*Kurortnoye, Feodosia, 298188, Russia*

<sup>3</sup> Prioksko-Terrasny State Nature Biosphere Reserve

*Danki, Serpukhov City District, Moscow Region, 142200, Russia*

Received 18.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0600

**Abstract.** The fluorescence and absorbance spectra of intact plant leaf cells from juniper *Juniperus excelsa*, Jerusalem-sage *Phlomis tuberosa*, butterbur *Petasites spurius*, centaury *Centaurea scabiosa* and wild chervil *Anthriscus sylvestris* have been obtained using the microspectrofluorimeter/microspectrophotometer MSF-15 (LOMO, St. Petersburg). The obtained spectra of autofluorescence and absorbance made it possible to test the composition of compounds outside the cell wall. This tool is able to detect the presence of secretions on the surface of intact cells, including secondary metabolites with the fluorescence maxima in the region of 530-550 nm, characteristic of phenolic compounds. In the absorbance spectra of leaves, maxima were found in the region of 580-620 nm, which is peculiar to blue pigments azulenes. The presence of azulenes on the surface of cells has been confirmed by short-term extraction of these pigments with ethanol or acetone. Similar methodical approach has been recommended for rapid analysis of intact surfaces of plant cells.

**Key words:** *absorbance, azulenes, fluorescence, phenols, secretory products, spectra.*