

С. В. КОНЕВ, И. Д. ВОЛОТОВСКИЙ

Формология

Издание второе, переработанное и дополненное

Допущено Министерством высшего и среднего специального образования БССР в качестве учебного пособия для студентов биологических специальностей высших учебных заведений

Минск
Издательство БГУ им. В. И. Ленина
1979

57.04
К 64

УДК 577 : 3 : 541.14 : 541.144.7 : 547.96 : 581.188.5 : 591.185.6

Рецензент

кафедра физико-химической биологии Московского государственного университета (зав. кафедрой кандидат биологических наук
Ф. Ф. Литвин)

Фотобиология. Изд. 2-е, перераб. и доп. Конев С. В., Вологовский И. Д. Минск, Изд-во БГУ им. В. И. Ленина, 1979.

В пособии рассматриваются важнейшие закономерности взаимодействия света с веществом, основные понятия фотофизики и фотохимии, общие стадии различных фотобиологических процессов и приводится классификация фотобиологических реакций. Подробно освещены практически все известные на данный момент фотобиологические процессы. Центральное место отведено систематическому описанию фотосинтеза и зрения. В соответствии с современными представлениями о механизмах фотобиологических реакций внимание читателя акцентируется также на молекулярных и мембранных аспектах проблемы.

Табл. 13, рис. 68, библиогр. в конце глав.

К $\frac{21005-025}{М317-79}$ 17-79

ПРЕДИСЛОВИЕ

Фотобиология — раздел биологической науки, изучающий закономерности и механизмы действия света на биологические системы различной сложности организации. В соответствии с многообразием биологических реакций, связанных с действием света, современная фотобиология разделилась на ряд самостоятельных дисциплин, изучающих определенные фотобиологические процессы. В свою очередь отдельный фотобиологический процесс представляет собой сложную последовательность различных стадий: фотофизика → первичная фотохимия → образование и превращение промежуточных фотопродуктов → молекулярные механизмы реализации → конечный биологический эффект. Эти стадии столь сильно различаются по своей природе, что требуют смены подходов исследования, поскольку фотобиологическая реакция имеет в начале чисто физический, а в конце чисто биологический характер. Каждая стадия представляет самостоятельный интерес для физика, химика и биолога. Иными словами, фотобиология находится на стыке физической, химической и биологической наук. По мере удаления от первичного, начального этапа процесс, инициируемый светом, становится больше физиологическим, чем биофизическим. Поэтому современная фотобиология рассматривает главным образом физико-химические превращения, непосредственно связанные с поглощением света.

Начиная со второй трети нашего столетия «старая» описательная фотобиология, изучавшая конечные ответные реакции организма на действие света и не рассматривавшая внутренние процессы, разделяющие «вход» и «выход» биологической системы, обогатилась новыми данными на квантовомеханическом и молекулярном уровнях. Расшифровка молекулярных механизмов фотобиологических реакций стала возможной благодаря расчленению клетки на фрагменты с выделением органелл, мембран, макромолекул, пигментов в чистом виде (ультрацентрифугирование, хроматография, электрофорез) и разработке прецизионных физических, физико-химических и биохимических методов исследования (дифференциальная спектрофотометрия, ди-

хроизм, спектры действия, люминесцентный анализ, электронный парамагнитный резонанс, спиновая метка, нефелометрия, ИК-спектроскопия, флеш-фотолиз и лазерная техника, электронная микроскопия и т. д.).

Целенаправленное проникновение во внутренние молекулярные механизмы фотобиологических реакций открывает перспективы сознательного управления ходом многих важных световых процессов, таких как фотосинтез или фитохром-зависимый морфогенез. С другой стороны, открывается возможность избирательного повреждения жизненно важных молекулярных структур с целью выяснения их биологической роли, локализации и взаимоотношения с другими структурно-функциональными компонентами клетки. Наконец, немаловажен и бионический аспект вопроса. Наиболее ценные находки живой природы, несомненно, окажутся полезными для техники и производства (промышленный синтез продуктов питания, светотехника, телевидение, искусственные органы зрения и т. д.).

Со времени выхода в свет первого издания (1974 г.) в фотобиологической науке произошли существенные изменения. Значительно расширился фронт исследований, вырос объем экспериментального материала, установлены новые количественные закономерности, что позволило не только уточнить, но и в ряде случаев пересмотреть некоторые схемы и положения. При подготовке второго издания авторы стремились дать современную трактовку механизмов фотобиологических реакций. Это привело не только к переработке и дополнению отдельных разделов пособия, но и к появлению новых глав, посвященных бактерородопсиновому синтезу АТФ, роли света в возникновении жизни на Земле и особенностям биологического действия лазерного излучения.

С. В. Конев, И. Д. Вологовский

Глава I. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СВЕТА С ВЕЩЕСТВОМ

1. ПРИРОДА СВЕТА

Свет представляет собой электромагнитное излучение (рис. 1), распространяющееся в пространстве с предельной в природе скоростью (в вакууме — около 300 000 км/с), с длинами волн от 400 до 700 нм. Оптический диапазон длин волн включает в себя также

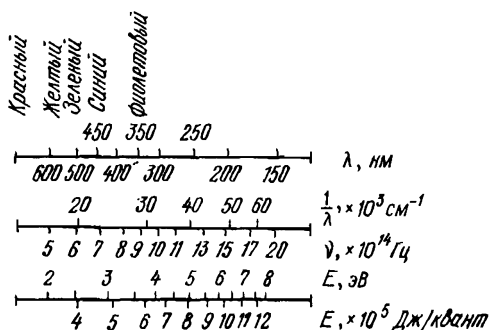


Рис. 1. Спектр оптического диапазона
электромагнитного излучения

инфракрасное (700—10 000 нм) и ультрафиолетовое (400—100 нм) излучения. Поперечно-плоская световая волна характеризуется электрическим и магнитным векторами напряженности полей, ориентированными взаимно перпендикулярно. Световой луч распространяется в направлении, перпендикулярном к электрическому и магнитному векторам. В прямом свете солнца или лампочки представлен большой набор электромагнитных волн, направления электрических векторов которых ориентированы случайным образом. Такой свет называется неполяризованным.

Если электрические векторы всех волн ориентированы в одном направлении, свет будет плоскополяризованным (линейно-поляризованным). Наряду с волновыми свет обладает корпускулярными свойствами, и тогда говорят о квантах (фотонах) света. Двойственная природа света находит отражение в соотношении Планка:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda},$$

где E — энергия кванта; h — постоянная Планка, равная $6,6256 \cdot 10^{-27}$ эрг·с; c — скорость света; ν — частота колебаний вектора; λ — длина световой волны.

Энергия, содержащаяся в одном моле квантов, получила название эйнштейн (1 эйнштейн = $N \cdot h\nu$, где N — число Авогадро, равное $6,022 \cdot 10^{23}$).

2. ЗАКОНЫ ПОГЛОЩЕНИЯ СВЕТА

Поглощение света внешне проявляется в ослаблении светового потока после прохождения через исследуемый объект. Поглощение тем больше, чем больше концентрация вещества, поглощательная способность его молекул и толщина слоя раствора. Для монохроматического света эти соотношения выражаются законом Ламберта — Бера:

$$I = I_0 e^{-\epsilon Cl}, \text{ или } \lg I_0/I = \epsilon Cl,$$

где I_0 и I — интенсивности падающего на объект и вышедшего из него света соответственно; ϵ — коэффициент поглощения, характеризующий поглощательную способность молекул вещества и зависящий от длины волны света; l — толщина слоя; C — концентрация вещества.

Из закона Ламберта — Бера вытекает, что хотя абсолютное количество поглощенной световой энергии прямо пропорционально интенсивности (мощности) светового потока, падающего на объект, процент (доля) поглощенного света от нее не зависит. Поэтому эффект поглощения оценивается не по абсолютной величине поглощенной световой энергии, а по ее отношению к интенсивности падающего на объект света. Так, коэффициент поглощения $(I_0 - I)/I_0$ показывает процент

поглощенного, а коэффициент пропускания (I/I_0) — процент прошедшего света. Из закона Ламберта—Бера видно также, что коэффициент поглощения не пропорционален концентрации вещества. Прямая пропорциональная зависимость выполняется между $\lg I_0/I$ и концентрацией вещества; $\lg I_0/I$ принято называть оптической плотностью раствора (D). Условлено определять оптическую плотность для толщины слоя 1 см. Оптическая плотность одномолярного раствора называется молярной экстинкцией. Иногда пользуются поперечным или молярным сечением поглощения, связанным с молярной экстинкцией соотношением $s = 3,8 \cdot 10^{-21} \epsilon$. Физический смысл поперечного сечения — площадь молекулы, абсолютно непроницаемая для света. (В табл. 1 приведены другие па-

Таблица 1. Параметры, используемые в абсорбционной спектрофотометрии

Название	Обозначение	Определяющее уравнение	Единица измерения
Пропускание	T	$T = 100 (I/I_0)$	%
Оптическая плотность	D	$D = \lg I_0/I$	безразмерная величина
Коэффициент экстинкции	ϵ	$\epsilon = D/x$	см ⁻¹
Удельный коэффициент ослабления	$\epsilon_{\text{уд}}$	$\epsilon_{\text{уд}} = \frac{D}{cx}$	л/г·см
Молярный коэффициент ослабления	ϵ_m	$\epsilon_m = \frac{D}{cx}$	л/моль·см
Коэффициент поглощения	μ	$\mu = \frac{1}{x} \ln \frac{I_0}{I}$	см ⁻¹
Молярный коэффициент поглощения	β	$\beta = \frac{\mu}{c}$	л/моль·см
Молярное сечение поглощения	s	$s = \frac{1}{nx} \ln \frac{I_0}{I}$	см ²

раметры для оценки поглощательной способности вещества.)

Свет различных длин волн поглощается одним и тем же веществом неодинаково. Зависимость поглощатель-

ной способности вещества от длины волны света называется спектром поглощения. Чаще всего используются зависимости типа $D=f(\lambda)$ или $\varepsilon=f(\lambda)$. Каждое вещество характеризуется специфическим спектром поглощения. Однако формальные законы поглощения света веществом еще не вскрывают внутренние механизмы поглощения.

Поглощение света веществом — внутримолекулярный физический процесс. Свет поглощается молекулами (их комплексами, атомами, радикалами, ионами), а не сложными биологическими структурами, такими, например, как ядра, митохондрии, клетки, сетчатка глаза. Исключения составляют лишь полупроводники, у которых в поглощении света участвуют обобществленные энергетические уровни, создающиеся в результате взаимодействия многих центров (атомов, ионов или молекул). Во взаимодействии вещества со светом, связанном с поглощением, проявляются как квантовые (корпускулярные), так и волновые свойства последнего.

Квантовая природа света выражается в том, что вся энергия, заключенная в кванте света, поглощается молекулой сразу (за время порядка 10^{-14} или менее секунд) и без остатка; следовательно, поглощение света веществом представляет собой дискретный, а не непрерывный процесс; волновая — в том, что поглощение света достигается в результате взаимодействия электронного облака молекулы с электрическим вектором световой волны. Взаимодействие магнитного вектора с молекулой пренебрежимо мало.

Физическая реакция поглощения света молекулой вещества (M) может быть записана в следующем виде: $M+h\nu \rightarrow M^*$, где M^* — возбужденное состояние молекулы. Возбужденная молекула M^* не отличается от обычной молекулы M по химическому составу или строению, но имеет несколько деформированное электронное облако и содержит избыточные запасы энергии. Разница (ΔE) в запасах энергии между M и M^* должна равняться энер-

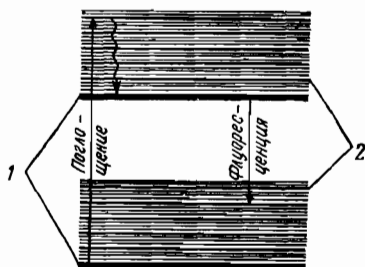
гии поглощенного кванта света, т. е. $E_M^* - E_M = \Delta E = h\nu$. Отсюда следует, что молекула может поглощать только те кванты, энергиям которых соответствуют тождественные энергетические емкости молекулы ($\Delta E = h\nu$).

Внутренняя энергия молекулы M (M^*) определяется

запасом энергии, заключенной в ее электронах ($E_{эл}$), в колебаниях ядер скелета молекулы ($E_{кол}$) и в различных вращательных движениях: $E_{полн} = E_{эл} + E_{кол} + E_{вр}$. Возрастание энергии молекул при $M \rightarrow M^*$ -переходе связано прежде всего с увеличением $E_{эл}$ и в значительно меньшей степени — с $E_{кол}$. Поскольку значения $E_{эл}$ и $E_{кол}$, а следовательно, и ΔE молекул квантованы и могут принимать лишь строго определенные дискретные значения, условие совпадения ΔE с $h\nu$ будет выполняться только для определенных длин волн света.

Рис. 2. Энергетические уровни молекулы и переходы между ними:

1 — электронные уровни; 2 — колебательные подуровни. Жирные линии соответствуют квантованным энергетическим уровням электронов, тонкие — квантованным колебательным уровням энергии молекулы, между которыми располагаются вращательные уровни. Расстояния между уровнями для простоты даны одинаковыми



Это обстоятельство является одной из основных причин возникновения спектров поглощения вещества.

Система электронных и колебательных энергетических уровней сложной органической молекулы в простейшем случае может быть изображена схемой, представленной на рис. 2. При не слишком высоких температурах поглощение света начинается от нижнего колебательно-го подуровня основного электронного уровня молекулы. Молекула может поглощать все кванты света, энергия которых равняется ΔE между этим подуровнем и всеми энергетическими подуровнями первого, второго и т. д. электронных уровней возбужденной молекулы. Следовательно, поглощаемый свет различных длин волн приводит к возникновению различающихся по запасам электронной (M_1^0 , M_2^0 и т. д.) или колебательной (M_1^{*0} , M_1^{*1} , M_1^{*2} и т. д.) энергии наборов возбужденных молекул. При этом переходы $M_0 \rightarrow M_1^{*0}$, $M_0 \rightarrow M_1^{*1}$ и т. д. формируют широкую длинноволновую, а переходы $M_0 \rightarrow M_2^{*0}$, $M_0 \rightarrow$

$\rightarrow M_2^{*1}$ — более коротковолновую полосы поглощения. Измерения электрической поляризуемости молекулы в момент поглощения показали, что переходу $M + h\nu \rightarrow M^*$ соответствует переброска на более высокий энергетический уровень (орбиту) лишь одного электрона молекулы (фотоэлектрона). *Поглощение света — это одноэлектронный одноквантовый физический процесс.*

Чаще всего фотоэлектроном сложных органических молекул является π -электрон, т. е. один из электронов, участвующих в образовании двойных, чаще делокализованных сопряженных связей молекулы: $\pi \rightarrow \pi^*$ -переход, или $\pi \rightarrow \pi^*$ -поглощение. Когда в качестве фотоэлектрона выступает электрон одинарной ковалентной локализованной σ -связи между соседними атомами молекулы, говорят о $\sigma \rightarrow \sigma^*$ -переходе (поглощении).

Из квантовой механики известно, что чем больше длина пробега электрона, чем «длиннее» его орбита, тем более часто располагаются энергетические уровни. Вполне понятно также, что молекулярная орбита сопряженных π -электронов, охватывающая всю молекулу, намного «длиннее» σ -орбит, опоясывающих лишь два соседних атома. Поэтому $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходы определяют обычно поглощение молекул в видимой и ультрафиолетовой областях спектра, а $\sigma \rightarrow \sigma^*$ -переходы — в достаточно коротковолновой области ультрафиолетового спектра. По этой же причине гемоглобин, имеющий обширную π -электронную систему, поглощает в зеленой области спектра, в то время как триптофан, обладающий сравнительно небольшой пространственной делокализацией π -электронов, поглощает в ультрафиолетовой области спектра (при 280 нм).

В органических соединениях, имеющих гетероатомы, т. е. атомы N, O, S, P, в качестве фотоэлектронов могут выступать неподеленные электроны, не принимающие участия в образовании химических связей ($n \rightarrow \pi^*$ -переходы).

При переходе фотоэлектронов на любой возбужденный уровень, как правило, наблюдаются следующие закономерности.

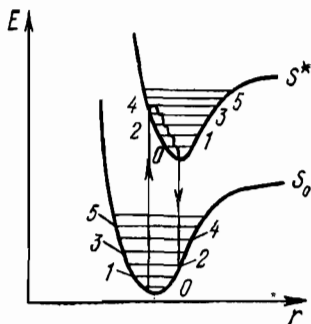
1. Переход не сопровождается нарушением спаренности внешних электронов: как в основном, так и в возбужденном состоянии ориентация спинов антипараллель-

на и суммарный спин электронов равен нулю. Поэтому основное (S_0) и возбужденное (S^*) состояния синглетные. Понятие «синглетность» (одиночность) заимствовано из спектроскопии.

2. Время, в течение которого квант света поглощается и электрон перебрасывается на возбужденный уровень, составляет 10^{-15} с. Период колебательных процессов молекулы (смещение ядер относительно положения равновесия) значительно больше — 10^{-13} с, поэтому за

Рис. 3. Кривые потенциальной энергии основного (S_0) и синглетного возбужденного (S^*) состояний двухатомной молекулы:

E — потенциальная энергия; r — межъядерное расстояние; 0—5 — колебательные подуровни состояний



время электронного перехода положение ядер в пространстве практически не изменяется. В системе кривых потенциальной энергии основного и возбужденного состояний (рис. 3) поглощение изображается вертикальной стрелкой. «Невертикальные» переходы наименее вероятны. Это так называемый принцип Франка — Кондона.

3. Каждому электронному переходу соответствует определенное направление осцилляции заряда относительно скелета молекулы: электрон выходит на возбужденный уровень по строго определенной траектории. На основе этого введено понятие осциллятора поглощения. Молекулы, расположенные в растворе таким образом, что их осцилляторы перпендикулярны электрическому вектору световой волны, вообще не будут поглощать свет. В общем случае вероятность поглощения пропорциональна величине проекции электрического вектора на направление осциллятора. Направления осцилляторов



Вероятность каждого из них находится как частное от деления константы данной скорости на сумму констант всех реакций, например вероятность фотохимической реакции

$$P_5 = \frac{K_5}{K_1 + K_2 + K_3 + K_4 + K_5}.$$

4. ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ

Одним из способов дезактивации электронно-возбужденных состояний является флуоресценция — физический внутримолекулярный процесс, который описывается уравнением $S^* \rightarrow S_0 + h\nu_{\text{фл.}}$. Возбужденная молекула переходит в основное состояние за время 10^{-8} — 10^{-9} с с испусканием кванта света. При этом фотоэлектрон опускается на различные колебательные подуровни основного состояния. Как и при поглощении, здесь выполняется принцип Франка—Кондона. Осциллятор флуоресценции обычно совпадает с осциллятором длинноволновой полосы поглощения. Основные характеристики флуоресценции: спектры излучения и возбуждения, квантовый выход, время жизни и поляризация.

Спектром флуоресценции называется зависимость интенсивности испускания от длины волны (частоты) света. Спектры флуоресценции сдвинуты в длинноволновую область по сравнению с длинноволновой полосой поглощения (правило Стокса) и зеркально-симметричны ей (правило Левшина). Правило Стокса означает, что энергия кванта флуоресценции меньше энергии кванта возбуждающего света. Это обусловлено двойной потерей энергии на пути между франк-кондоновским и равновес-

ным электронно-колебательным основным состоянием (см. рис. 4). Кроме того, благодаря процессам внутренней конверсии спектры флуоресценции не зависят от длины волны возбуждающего света. Длина волны, при которой пересекаются спектры флуоресценции и поглощения, соответствует чисто электронному 0—0-переходу. Энергия излучаемого при этом кванта соответствует энергии синглетного электронно-возбужденного состояния, которая может использоваться при фотохимических реакциях. Колебательная структура спектров флуоресценции отражает систему колебательных подуровней основного состояния молекулы. Как и спектры поглощения, спектры флуоресценции являются индивидуальной характеристикой вещества.

Квантовый выход флуоресценции (V) — отношение количества высвеченных ($n_{\text{фл}}$) квантов к поглощенным ($n_{\text{п}}$) — отражает вероятность дезактивации синглетного возбужденного состояния по излучательному пути: $V = n_{\text{фл}}/n_{\text{п}}$. Как правило, его величина меньше единицы. Квантовый выход флуоресценции имеет постоянные значения, независимо от того, светом какой длины волны в пределах полосы поглощения освещают вещество (закон Вавилова). Причина этого — установление теплового равновесия в системе возбужденная молекула — среда с испусканием квантов с одного и того же нижнего колебательного подуровня возбужденного состояния. Закон постоянства квантового выхода дает возможность определять спектры поглощения веществ с помощью флуориметрических измерений, что приобретает особое значение для поликомпонентных систем, сильно рассеивающих свет. При этом измеряют так называемые спектры возбуждения (действия) флуоресценции, которые показывают, насколько эффективен свет той или иной длины волны для возбуждения свечения:

$$n_{\text{фл}}/n_{\text{в}} = f(\lambda),$$

где $n_{\text{фл}}$ — количество квантов флуоресценции; $n_{\text{в}}$ — количество квантов возбуждающего (падающего на объект) света.

Естественно, что при одной и той же квантовой интенсивности возбуждающего света количество возбужденных молекул, а следовательно, и интенсивность флуорес-

ценции будут прямо пропорциональны поглощению: $i(\lambda) = B(1 - T)$. Вследствие этого спектр возбуждения флуоресценции должен совпадать со спектром поглощения вещества. Такое совпадение имеет место для образцов с низкими значениями D ($D < 0,2$). В этих случаях между коэффициентом поглощения и его логарифмом соблюдается близкая к линейной зависимость. При $D \geq 2$ практически все кванты поглощаются образцом и спектр действия превращается в прямую линию, параллельную оси абсцисс (длин волн) в соответствии с законом Вавилова.

Длительность флуоресценции, или время жизни возбужденного состояния (τ), непосредственно связана с вероятностью излучательного перехода (P) и отражает среднестатистическое время существования возбужденного состояния. Одновременно возбужденные молекулы дезактивируются по мономолекулярному (экспоненциальному) закону: $I = I_0 e^{-t/\tau}$ (τ представляет собой время, в течение которого интенсивность свечения уменьшается в e (2,7) раз). Измеренное в эксперименте τ имеет заниженное по сравнению с естественным (τ_0), определяемым только внутренними свойствами молекулы, значение. Причиной этого является безызлучательная, тепловая диссипация энергии — тушение второго рода, происходящее в течение всего времени жизни возбужденного состояния. Если $\tau_0 = 1/P$, то $\tau = 1/(P + q)$, где q — вероятность тушения. Между B и τ часто соблюдается пропорциональность, и $B/B_0 = \tau/\tau_0$. Длительность затухания флуоресценции в различных участках ее спектра обычно одинакова.

Поляризация флуоресценции. В молекулах осцилляторы прямого (поглощение) и обратного (флуоресценция) переходов $S_0 \rightleftharpoons S$ ориентированы одинаково. Поэтому при освещении раствора поляризованным светом флуоресценция будет также поляризована, если за время возбужденного состояния молекулы не успеют переориентироваться. Поляризованность флуоресценции оценивается по степени поляризации:

$$P_{\text{фл}} = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}},$$

где $I_{\parallel}$ и $I_{\perp}$ — интенсивности световых потоков флуоре-

сценции, поляризованных взаимно перпендикулярно (I_{Π} поляризована аналогично возбуждающему свету).

При этом степень поляризации флуоресценции всегда меньше, чем возбуждающего света ($P=1$). (Теоретически $P_{\text{фл}}$ может достигать значения 0,5 *).)

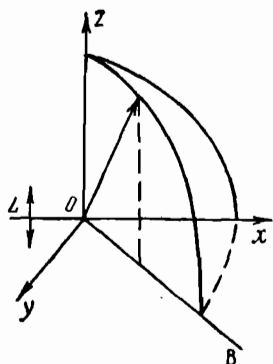


Рис. 5. Поляризация люминесценции одного из неподвижных диполей (распределение диполей по направлениям статистическое)

Объясняется это тем, что линейно-поляризованный свет возбуждает не только молекулы, осцилляторы которых параллельны электрическому вектору, но и молекулы, которые имеют составляющие своих осцилляторов, параллельные электрическому вектору (рис. 5). Вероятность возбуждения пропорциональна косинусу угла между осциллятором и электрическим вектором возбуждающего света. Интегрирование по всем ориентациям дает предельные значения степени поляризации ($P_{\text{фл}}=0,5$). Реальные значения $P_{\text{фл}}$ зависят от степени релаксации молекулы за время возбужденного состояния и связываются с предельными значениями P_0 формулой Перрена:

$$\frac{1}{P} - \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \left(\tau \frac{RT}{V\eta} + 1 \right),$$

где R — газовая постоянная; T — абсолютная температура; η — вязкость среды; V — молекулярный объем флуоресцирующих молекул; P_0 — предельные значения поляризации при $T/\eta \rightarrow 0$.

Отсюда может быть определено τ , если известен молекулярный объем (вес). При возбуждении объектов поляризованным монохроматическим светом различных длин волн (λ) $P_{\text{фл}}$ изменяется, принимая как положительные, так и отрицательные значения.

*) Для плоских осцилляторов, поглощающих свет в двух измерениях (симметричные молекулы), предельные значения $P_{\text{фл}}$ еще меньше — 0,14.

Зависимость $P_{\text{фл}} = f(\lambda_{\text{в}})$ называется поляризационным спектром флуоресценции (по поглощению). Обычно осцилляторы, соответствующие электронным переходам $S_0 \rightarrow S_1$ и $S_0 \rightarrow S_2$, ответственным за первую и вторую полосы поглощения, взаимно перпендикулярны и лежат в плоскости молекулы (для $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходов). Именно поэтому $P_{\text{фл}}$ при возбуждении во второй полосе поглощения имеет отрицательные значения. В промежуточных точках значения $P_{\text{фл}}$ связаны с углом между эффективным осциллятором поглощения (сумма взаимно перпендикулярных векторов-осцилляторов с учетом их вкладов в поглощение) и осциллятором флуоресценции. Следовательно, поляризационные спектры флуоресценции по поглощению выявляют взаимоориентацию осцилляторов различных электронных переходов. После расположения молекул в одном преимущественном направлении (наложение электрического поля или механическое растяжение полимерной пленки с включенными в нее молекулами флуорохрома) может быть установлена и абсолютная ориентация осцилляторов относительно скелета молекулы. Осцилляторы, соответствующие $n \rightarrow \pi^*$ -поглощению и $\pi^* \rightarrow n$ -флуоресценции, перпендикулярны к плоскости молекулы.

Поляризационные спектры флуоресценции по испусканию отражают зависимость $P_{\text{фл}}$ от длины волны регистрации по ее спектру при фиксированной длине волны возбуждения: $P_{\text{фл}} = f(\lambda_{\text{рег}})$. Обычно соблюдается постоянство $P_{\text{фл}}$ по всему спектру флуоресценции, что подтверждает испускание с одного и того же возбужденного уровня.

Наконец, из-за поперечного характера световой волны даже при возбуждении объектов естественным (неполяризованным) светом наблюдается частично поляризованная флуоресценция (спонтанная поляризация $P_{\text{сп}}$). При этом наибольшая поляризация флуоресценции, меньшая, однако, чем при использовании линейно-поляризованного возбуждающего света, наблюдается при регистрации свечения под углом 90° к направлению распространения луча возбуждения: $P_{\text{сп}} = P/(2 - P)$. Ориентация молекул в образце влияет на степень как обычной, так и спонтанной поляризации, а также на поляризационные спектры флуоресценции. Варьируя угол наблюдения поляризации

флуоресценции, можно установить направление и степень ориентации молекул в образце.

5. ИНТЕРКОМБИНАЦИОННАЯ КОНВЕРСИЯ, ТРИПЛЕТНЫЕ СОСТОЯНИЯ И ФОСФОРЕСЦЕНЦИЯ

Наряду с синглетными (S) молекула обладает триплетными (T) электронными уровнями, расположенными в шкале энергий ниже, чем синглетные. Переход синглетного возбужденного состояния за время около 10^{-12} с в триплетное называется *интеркомбинационной конверсией*: $S_1 \rightarrow T$. Эта внутримолекулярная физическая реакция происходит в местах пересечения кривых потенциальной энергии синглетного и триплетного состояний. При интеркомбинационной конверсии ориентация спина фотоэлектрона меняется на противоположную, в результате чего спины двух ранее спаренных электронов становятся параллельными. Триплетная молекула приобретает парамагнитные свойства, приближаясь к бирадикалу. Во внешнем магнитном поле триплетный уровень расщепляется на три составляющих уровня, каждый из которых соответствует одному из трех типов ориентации суммарного спина: по полю, перпендикулярно и против поля. Так появился термин «триплетное состояние». Переход синглетное $\rightarrow$ триплетное состояние (состояния разной мультиплетности) запрещен квантовомеханическими правилами отбора: спиновый запрет и запрет по симметрии. Однако из-за спин-орбитальных взаимодействий (между спиновым магнитным моментом фотоэлектрона и орбитальным моментом) в триплетном состоянии всегда есть примесь синглетного (и наоборот) и вероятность синглет-триплетного перехода резко возрастает, особенно в присутствии тяжелых атомов.

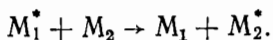
Триплетное состояние дезактивируется теми же путями, что и синглетное. При излучательной дезактивации ($T \rightarrow S_0$ -переход) триплетной молекулы высвечивается квант фосфоресценции. Фосфоресценция характеризуется теми же специфическими параметрами, что и флуоресценция: спектром, квантовым выходом, длительностью возбужденного состояния и поляризацией. Спектры фосфоресценции сдвинуты в длинноволновую область по

сравнению со спектрами флуоресценции и формируются при излучательных переходах фотоэлектрона с нижнего колебательного подуровня «триплета» на различные колебательные подуровни основного состояния.

Вследствие квантовомеханических запретов длительность фосфоресценции имеет довольно большие значения. У различных органических соединений она колеблется от 10^{-4} до 10^2 с. Обычно осциллятор излучательного перехода $T \rightarrow S_0$ у ароматических соединений перпендикулярен к плоскости кольца и не совпадает по направлению с осциллятором поглощения и флуоресценции, т. е. $P_{\text{фосф}}$ имеет отрицательные значения. Триpletное состояние дезактивируется также тепловым, миграционным и фотохимическим путями. Триpletная молекула может переходить в синглетное возбужденное состояние либо за счет тепловой энергии, либо при взаимодействии с другой триpletной молекулой. В обоих случаях наблюдается замедленное свечение, сходное по спектрам с флуоресценцией, а по длительности — с фосфоресценцией. Кроме того, триpletная молекула может поглотить второй квант света, в результате чего фотоэлектрон переходит на второй триpletный уровень — триplet (T_1)-триpletное (T_2) поглощение.

6. МИГРАЦИЯ ЭНЕРГИИ

Под миграцией энергии понимается безызлучательный обмен энергией между электронно-возбужденной молекулой (донором) и молекулой в основном состоянии (акцептором):



Миграция энергии — чисто физический процесс, не сопровождающийся химическим изменением вещества. Она может происходить как между одинаковыми ($M \rightarrow M$), так и между разными ($M_1 \rightarrow M_2$) молекулами в направлении от более высокого к более низкому или одинаковому энергетическому уровню. Известно несколько механизмов миграции энергии: индуктивно-резонансный, экситонный, обменно-резонансный и полупроводниковый (зонная проводимость).

Индуктивно-резонансная миграция энергии. Исходным фактом, который заставил принять концепцию индуктивно-резонансной миграции энергии, было явление сенсibilизированной флуоресценции красителей, т. е. эффективное возбуждение флуоресценции молекул M_2 светом, поглощаемым молекулами M_1 (Вавилов, Левшин, Галанин, Перрен, Ферстер и др.). При этом для эффекта сенсibilизации не требовалось ни соударений между M_1 и M_2 (опыты в вязких средах), ни реабсорбции — поглощения M_2 света флуоресценции M_1 (опыты в тонких слоях).

При определенных условиях к M_2 безызлучательным путем передавалась практически вся энергия M_1^* (эффективность миграции энергии равна единице) через большие межмолекулярные расстояния порядка 20—100 Å. Передача энергии осуществляется за счет диполь-дипольных взаимодействий между M_1^* и M_2 без переноса каких-либо частиц вещества или световых квантов. В этом случае энергия взаимодействия обратно пропорциональна третьей степени межмолекулярных расстояний (R), а вероятность миграции, в свою очередь, пропорциональна квадрату энергии взаимодействия, т. е. обратно пропорциональна R^6 . Следует четко различать возбуждение M_2 энергией M_1 за счет миграции энергии и тривиальный эффект возбуждения M_2 при реабсорбции флуоресценции M_1 . По существу, для протекания индуктивно-резонансной миграции энергии необходимо только, чтобы M_1 и M_2 имели одинаковые ΔE между определенными энергетическими уровнями (условие резонанса) и чтобы взаимодействия между ними были достаточно интенсивны (условие индукции). Для соблюдения этих условий необходимо и достаточно выполнение трех правил Ферстера.

1. Донор энергии (M_1^*) должен обладать способностью к флуоресценции. Другими словами, для установления взаимодействий, приводящих к миграции энергии, необходим промежуток времени, соизмеримый со временем жизни флуоресценции ($\sim 10^{-9}$ с).

2. Спектр флуоресценции донора (M_1) должен перекрываться со спектром поглощения акцептора (M_2). Эффективность миграции прямо пропорциональна интегралу (площади) перекрытия. Следовательно, чем боль-

ше одинаковых для переходов $M_1^* \rightarrow M_1$ и $M_2 \rightarrow M_2^*$ частот, тем больше вероятность резонанса.

3. Донор (M_1) и акцептор (M_2) должны быть сближены на определенные расстояния (R), причем эффективность миграции энергии, как уже отмечалось, растет обратно пропорционально R^6 . Расстояния, при которых происходит миграция энергии между донором и акцептором, принято характеризовать так называемым критическим радиусом R_0 , при котором донор с одинаковой вероятностью отдает свою энергию на люминесценцию и миграцию энергии. Радиус R_0 колеблется для различных пар молекул от 10 до 100 Å и определяется временем жизни возбужденного состояния донора, интегралом перекрытия спектров и величиной мигрирующих порций энергии. Эффективность миграции энергии k связана с этими параметрами уравнением Ферстера:

$$k_{D \rightarrow A} = \frac{9000 \ln 10 \kappa^2 V_{\text{фл}}}{128 \pi^6 n^4 N \tau_D R_{\text{ДА}}^6} \int_0^\infty f_D(\nu) \varepsilon_A(\nu) \frac{d\nu}{\nu^4},$$

где $R_{\text{ДА}}$ — межмолекулярное расстояние между донором и акцептором; τ_D — естественное время жизни возбужденного состояния донора; N — число Авогадро; n — показатель преломления растворителя; κ^2 — ориентационный фактор, равный 2/3; $V_{\text{фл}}$ — квантовый выход флуоресценции; $f_D(\nu)$ — спектральное распределение квантовой интенсивности флуоресценции донора (нормированной к единице); $\varepsilon_A(\nu)$ — молярный коэффициент поглощения акцептора как функция ν (ν — частота).

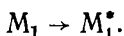
Индуктивно-резонансная миграция энергии практически не зависит от того, связаны M_1 и M_2 между собой химическими, ковалентными связями или нет. В первом случае, однако, условно принято говорить о *внутримолекулярной*, а во втором — о *межмолекулярной* миграции энергии.

Наиболее распространены следующие экспериментальные методы обнаружения процесса переноса энергии.

1. Спектры действия (возбуждения) или измерения квантовых выходов процесса при различных длинах волн возбуждающего света. Появление в спектре действия M_2 полос поглощения M_1 говорит о переносе энергии, а сопо-

ставление квантовых выходов процесса при возбуждении в полосах поглощения M_1 и M_2 используется для оценки эффективности миграции энергии (равенство выходов указывает на 100%-ную эффективность переноса).

2. Поляризационные спектры люминесценции системы $M_1 + M_2$. Даже однократный перенос энергии от M_1 к M_2 для хаотически распределенных молекул сопровождается практически полной деполяризацией флуоресценции M_2 . Поэтому по эффекту деполяризации флуоресценции M_2 в вязких средах, где исключена возможность релаксации молекулы за время жизни возбужденного состояния, можно следить за переносом энергии. Этот прием пригоден также для обнаружения и оценки эффективности переноса энергии между однородными молекулами:



3. Измерения кинетики затухания флуоресценции M_2 при возбуждении ее в полосах поглощения M_2 и M_1 . Поскольку перенос энергии $M_1 \rightarrow M_2^*$ требует известного времени, процесс $h\nu + M_2 \rightarrow M_2^* \rightarrow M_2 + h\nu_{\text{фл}}$ «закончится» несколько раньше, чем процесс $h\nu + M_1 \rightarrow M_1^* \rightarrow M_2^* \rightarrow M_2 + h\nu_{\text{фл}}$.

К настоящему времени накоплено достаточно большое количество фактов, указывающих на протекание индуктивно-резонансной миграции энергии в биологических системах. Внутримолекулярная миграция энергии обнаружена, в частности, у белков, пигментов, коферментов, хромопротеидов. Внутримолекулярный перенос энергии зарегистрирован для многих донорно-акцепторных пар: ароматические аминокислоты белка $\rightarrow$ фикобилины (фотосинтетические пигменты красных и сине-зеленых водорослей хромопротеидной природы — фикоэритрин и фикоцианин); тирозин $\rightarrow$ триптофан, триптофан $\rightarrow$ триптофан, триптофан $\rightarrow$ ионизированный тирозин ($R-O^-$) в различных белках; ароматические аминокислоты $\rightarrow$ краситель в ковалентных или абсорбционных комплексах белок — краситель; адениновое $\rightarrow$ никотинамидное кольцо в НАД; адениновое $\rightarrow$ изоаллоксазиновое кольцо в ФАД; тиазоловое $\rightarrow$ пиримидиновое кольцо в тиамине (витамин B_1) и др. Столь же многочис-

ленные и примеры межмолекулярной миграции энергии: фикоэритрин—фикоцианин—хлорофилл *a* (водоросли), хлорофилл *b*—хлорофилл *a* (высшие растения) и т. д.

Индуктивно-резонансная миграция энергии возможна как между синглетными уровнями донора и акцептора, так и между синглетным уровнем донора и триплетным уровнем акцептора.

Экситонная миграция энергии. Теория экситонной миграции энергии была впервые разработана Я. М. Френкелем в 1936 г. По своей природе этот тип переноса энергии близок к механизмам индуктивного резонанса. Как и при индуктивном резонансе, экситонный перенос возникает вследствие электрических, диполь-дипольных взаимодействий между молекулами или ионами. Однако экситонный перенос предполагает более интенсивные, чем индуктивный резонанс, межмолекулярные взаимодейст-

Таблица 2. Характеристики различных механизмов миграции энергии

Механизм переноса	Время t переноса, с	Энергия взаимодействия E , см ⁻¹	Концентрация C , моль	Радиус R , Å	Зависимость от R
Делокализованный «молекулярный экситон»					
быстрый	$< 3 \cdot 10^{-14}$	> 1000	> 5	< 5	R^{-3}
промежуточный	$3 \cdot 10^{-14} \div + 3 \cdot 10^{-12}$	10—1000	0,1—5	5—20	R^{-3}
Медленный локализованный «резонансный перенос»	$3 \cdot 10^{-12} \div + 3 \cdot 10^{-8}$	0,1—10	$3 \cdot 10^{-4} \div + 10^{-1}$	20—100	R^{-6}

вия. Вследствие этого вероятность обмена энергией между соседними молекулами неизмеримо возрастает: время обмена составляет 10^{-12} — 10^{-14} с вместо 10^{-8} — 10^{-12} с в случае индуктивного резонанса (табл. 2).

Основным критерием, обуславливающим эффектив-

ность миграции экситона, является соотношение силы межмолекулярного электронного взаимодействия между донором и акцептором и силы внутримолекулярной связи в доноре. Если первая величина значительно больше второй, мы имеем дело с так называемым свободным экситоном Френкеля и вероятность переноса будет обратно пропорциональна третьей степени расстояния между молекулами ($1/R^3$). В этих условиях скорость переноса настолько высока (10^{-15} с), что она сравнима с временем единичного акта поглощения. Поэтому фотоэлектрон донора может практически сразу попасть не только на свой возбужденный уровень, но и на любой из подуровней сильно взаимодействующих между собой n молекул. Как следствие наблюдается экситонное расщепление уровней энергии (полос в спектре поглощения) — эффект Давыдова. В результате точные координаты локализации возбужденного состояния в многомолекулярной системе делаются неопределенными и энергия как бы «размазывается» по достаточно большому объему. Наиболее благоприятные условия для возникновения экситонных механизмов — это кристаллическая организация вещества, когда за период одного элементарного переноса не успевает осуществиться пространственная релаксация центров кристаллической решетки. Высокая скорость экситонного переноса позволяет энергии электронного возбуждения мигрировать и тогда, когда молекулы не обладают способностью к флуоресценции.

Как и при индуктивном резонансе, при экситонной миграции энергии не отмечается эффекта фотопроводимости или уменьшения электрического сопротивления образца при освещении. Иными словами, молекулы обмениваются не электронами, а только электронным возбуждением, т. е. как бы сцепленной парой: возбужденный электрон — его вакансия на более низком энергетическом уровне. Экситонная миграция энергии возможна как между синглетными возбужденными (синглет-синглетный перенос), так и между триплетными (триплет-триплетный перенос) уровнями.

Обменно-резонансная (триплет-триплетная) миграция энергии была впервые обнаружена А. Н. Терениным и В. Л. Ермолаевым в 1952 г. При обменно-резонансной миграции энергия переносится с триплетного уровня до-

нора на триплетный уровень акцептора в соответствии с формулой



не в результате индуктивно-резонансного взаимодействия молекул, а при прямом перекрывании «триплетных» электронных орбит (электронных облаков) за счет электростатических взаимодействий электронов донора и акцептора. Чем больше объем перекрывания, тем вероятнее перенос, при котором партнеры взаимно обмениваются своими электронами: донор получает «богатый» энергией электрон акцептора, отдавая ему свой «бедный» энергией электрон. Отсюда возник и сам термин «обменно-резонансный перенос». Для него необходимо большее сближение молекул ($R_0 < 20 \text{ \AA}$), чем для индуктивно-резонансного переноса. Вследствие экспоненциального характера убывания плотности «электронного газа» с расстоянием эффективность переноса обратно пропорциональна шестой степени межмолекулярного расстояния $1/R^6$. При максимальном сближении молекул в системах донор — молекулы растворимого вещества, акцептор — молекулы растворителя скорость переноса триплетной энергии делается соизмеримой со скоростью внутренней конверсии ($\sim 10^{-11} \text{ с}$).

Вероятность индуктивно-резонансной миграции энергии прямо пропорциональна силе осциллятора синглет-синглетного перехода в акцепторе. В противоположность этому вероятность триплет-триплетного переноса не зависит от силы осциллятора триплет-синглетного перехода в акцепторе. Для обнаружения триплет-триплетной миграции используется явление сенсibilизированной фосфоресценции. Подбирается такая донор-акцепторная пара органических молекул, у которой синглетный уровень донора лежит ниже синглетного уровня акцептора (что исключает синглет-синглетный перенос), а триплетный уровень донора, наоборот, выше триплетного уровня акцептора. Если при этих условиях свет, поглощаемый донором, возбуждает фосфоресценцию акцептора и одновременно наблюдается тушение собственной фосфоресценции донора при незначительных сокращениях его длительности, это однозначно указывает на триплет-триплетный перенос. Триплет-триплетный перенос энер-

гии возможен и с высоких триплетных уровней молекулы (Алфимов). При определенных условиях может происходить также и межмолекулярный перенос энергии, запрещенный спиновыми правилами отбора: триплет-синглетная и синглет-триплетная миграция энергии. Однако вероятность таких процессов в 10^4 — 10^6 раз меньшая, чем у интеркомбинационно-разрешенных переносов, осуществляющихся без изменения спина системы (синглет-синглетная или триплет-триплетная миграция энергии).

Полупроводниковая миграция энергии (зонная проводимость) отличается от рассмотренных тем, что энергия переносится с помощью относительно свободно перемещающихся зарядов. Все твердые тела по своим электрическим свойствам разделяются на проводники, изоляторы и полупроводники. В основу такого подразделения положен характер строения и заполнения электронами энергетических уровней (орбит). Каждая из электронных орбит атомов или молекул в твердых, преимущественно кристаллических телах, формирует зоны близко расположенных уровней с участием лишь внешних валентных электронов (электроны внутренних оболочек прочно связаны с ядром). При этом возникают делокализованные орбиты, распространяющиеся практически на весь кристалл, и электрон получает возможность передвигаться в его пределах. В проводниках обычно создается одна зона, частично заполненная электронами. Поэтому при наложении напряжения заряды, используя незаполненные уровни, могут легко перемещаться — возникает электрический ток. В противоположность этому у полупроводников и изоляторов валентная (заполненная) зона энергетических уровней отделена от зоны проводимости не заполненной электронами запрещенной зоной ΔE . У изоляторов энергетическая «ширина» запретной зоны больше ($\Delta E > 3$ эВ), чем у полупроводников ($\Delta E < 3$ эВ). Следовательно, у полупроводников электрический ток возникает только тогда, когда электрон из валентной заполненной зоны попадает в зону проводимости, т. е. приобретает внешнюю энергию, равную или большую ΔE . Одним из источников этой энергии является свет. При освещении резко возрастает электропроводность — явление фотопроводимости. «Ширина» запретной зоны определяется по красной границе электропро-

подности, т. е. максимальной длине волны (минимальной энергии кванта) монохроматического света, способного увеличивать электропроводность объекта. Только начиная с момента, когда $h\nu = \Delta E$, свет увеличивает электропроводность вещества.

Явление фотопроводимости широко используется для обнаружения у веществ полупроводниковых свойств, способности к зонной миграции энергии. Наряду с собствен-

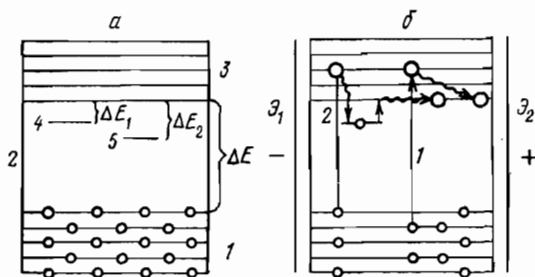


Рис. 6. Схема расположения энергетических уровней в полупроводнике и фотопроводимость:

а: 1 — валентная (заполненная) зона; 2 — запрещенная зона; 3 — зона проводимости; 4 и 5 — примесные уровни; ΔE , ΔE_1 и ΔE_2 — энергетическая ширина запрещенной зоны и энергетическое расстояние примесных уровней от зоны проводимости; б: 1 — переход электрона в зону проводимости под действием кванта света; 2 — переход электрона на примесный уровень (ловушку) с возвращением в зону проводимости; $\mathcal{E}_1$ и $\mathcal{E}_2$ — электроды

ной возможна и примесная полупроводимость, когда электроны поставляются в зону проводимости не из валентной зоны основного вещества, а из примесей, входящих в состав решетки и имеющих энергетические уровни, лежащие между валентной и проводящей зоной (рис. 6).

Перейдя под действием внешней энергии из валентной зоны в зону проводимости, электрон оставляет в ней свободный энергетический уровень, электронную вакансию — дырку. Как и сам электрон в зоне проводимости, дырка способна свободно, без дополнительной активации перемещаться по валентной зоне в результате обменных реакций соседний электрон — электронная вакансия. Поэтому различают дырочную (p — *positive*) и электронную (n — *negative*) полупроводимости. Дырочная полу-

проводимость возникает у кристаллов, у которых электроны в зоне проводимости быстро захватываются ловушками. Вслед за возникновением пары электрон — дырка могут происходить следующие события: 1) быстрое (10^{-8} с) падение электрона и рекомбинация его с дыркой — люминесценция или деградация энергии в тепло; 2) перемещение как единого целого пары электрон-дырка — экситон, которое не сопровождается увеличением проводимости и сводится, по существу, к миграции энергии; 3) независимые перемещения электрона и (или) дырки по своим зонам, которые сопровождаются ростом проводимости и представляют собой миграцию как электрона, так и связанной с ним потенциальной энергии. При достижении подходящего электронного уровня (расположенного ниже) «примесной» молекулы, атома или иона электрон может упасть на него, отдавая свою энергию и иницируя реакцию восстановления вещества. Сходным образом и дырка в пространственном отдалении от места возникновения в состоянии воспринять электрон от донора (реакция окисления); 4) оказавшись «около» примесных уровней кристалла, расположенных ниже зоны проводимости, но выше валентной зоны, электрон зоны проводимости падает на них и попадает в так называемую ловушку, из которой он может выбраться только с помощью источника внешней энергии — тепловых или световых квантов с энергией, большей или равной $E_{\text{лов}}$. Поэтому энергия электронного возбуждения оказывается законсервированной, а полупроводник выступает в роли аккумулятора свободной энергии. Нагревание или освещение полупроводника восстанавливает заселенность электронами зоны проводимости и сопровождается процессами термолюминесценции и индуцированной светом люминесценции.

Так как $E_{h\nu} > E_{\text{лов}}$ (см. рис. 6), то при освещении красным или инфракрасным светом спектр люминесценции может располагаться в синей или даже ультрафиолетовой области с кажущимся нарушением первого закона термодинамики.

Следовательно, в противоположность другим механизмам миграции энергии полупроводниковый, зонный, перенос связан с транслокацией *не только энергии, но и зарядов*, что делает возможным пространственное разде-

ление первичного окислителя (дырка) и первичного восстановителя (электрон), а также длительное запасание энергии в ловушках электронов.

Рекомендуемая литература

- Баренбойм Г. М., Доманский А. И., Туроверов К. К. Люминесценция биополимеров и клеток. Л., 1966.
- Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения. Л., 1977.
- Владимиров Ю. А. Фотохимия и люминесценция белков. М., 1965.
- Владимиров Ю. А., Литвин Ф. Ф. Фотобиология и спектральные методы исследования. М., 1964.
- Гуринович Г. П., Соловьев К. Н., Севченко А. Н. Спектроскопия хлорофилла и родственных соединений. Минск, 1968.
- Дитчберн Р. Физическая оптика. М., 1965.
- Калверт Дж., Питтс Дж. Фотохимия. М., 1968.
- Конев С. В. Электронно-возбужденные состояния биополимеров. Минск, 1965.
- Левшин В. Л. Фотолюминесценция жидких и твердых веществ. М., 1951.
- Мак Глинн С., Адзуми Т., Киносита М. Молекулярная спектроскопия триплетного состояния. М., 1972.
- Молекулярная фотоника. Л., 1970.
- Рао Ч. Электронные спектры в химии. М., 1964.
- Рид С. Электронно-возбужденные состояния в химии и биологии. М., 1960.
- Спайс Дж. Химическая связь и строение. М., 1966.
- Степанов Б. И. Люминесценция сложных молекул. Минск, 1955.
- Теренин А. Н. Фотоника молекул красителей. М.—Л., 1967.
- Феофилов П. П. Поляризованная люминесценция атомов, молекул и кристаллов. М., 1959.
- Черницкий Е. А. Люминесценция и структурная лабильность белков в растворе и клетке. Минск, 1972.
- Юденфренд С. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. М., 1965.

Глава II. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФОТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

1. ОСНОВНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОТОХИМИИ

Фотохимические превращения претерпевают молекулы не в основном (M), а в электронно-возбужденном состоянии (M^*). Поэтому вызывать их может лишь по-

глощенный свет (правило Гротгуса — Дрейпера), а количество образовавшихся фотопродуктов (Π) определяется дозой — произведением интенсивности падающего света (I) на время облучения (t). Иными словами, для необратимой одноквантовой фотохимической реакции, в ходе которой поглощение системы заметно не изменяется, одинаковые произведения It создают одинаковые количества фотопродукта, независимо от численных значений, которые принимают I и t в отдельности. Так, если $It = I_1 t_1 = I_2 t_2 = \dots = I_n t_n$, то $\Pi_1 = \Pi_2 = \dots = \Pi_n$ (правило Бунзена — Роско, или правило взаимозаменяемости интенсивности и времени действия света). Правила Гротгуса — Дрейпера и Бунзена — Роско более строго объединяются в законе Вант-Гоффа, по которому скорость фотохимической реакции ($-dc/dt$) определяется «скоростью» поглощения световой энергии или скоростью возникновения M^* :

$$-dc/dt = \text{const} I_0 (1 - e^{-\epsilon c l}),$$

где $I_0(1 - e^{-\epsilon c l})$ характеризует световую энергию, поглощаемую в единицу времени.

Поскольку свет имеет фотонную природу, первичным изменением после каждого поглощения кванта света является только одно физическое или химическое превращение молекулы (закон эквивалентности Эйнштейна — Штарка). Однако в случае цепных реакций первичный фотопродукт может генерировать большое количество вторичных продуктов и кажущийся квантовый выход реакций будет больше единицы. С другой стороны, известны и такие реакции, когда для образования конечного продукта необходимо последовательное поглощение двух квантов света (двухквантовые реакции: $S_0 + h\nu_1 \rightarrow S^* \rightarrow T_1 + h\nu_2 \rightarrow T_2 \rightarrow \text{продукт}$).

Таким образом, важнейшей количественной характеристикой фотохимической реакции является квантовый выход $\Phi = n_1/n_2$, где n_1 — число прореагировавших молекул, а n_2 — число молекул, поглотивших фотоны. Его величина определяется отношением констант скорости фотохимической дезактивации электронно-возбужденного состояния к сумме констант скорости других процессов дезактивации, рассмотренных в предыдущей главе.

Для характеристики фотохимической реакции исполь-

зуют понятие «фоточувствительность», или поперечное сечение (σ), которое выражается произведением поперечного сечения поглощения (s) активного света на квантовый выход реакции (φ): $\sigma = s\varphi$. Физический смысл фоточувствительности, по определению А. Н. Теренина, — вероятность, с которой фотон, «эффективно попавший» в молекулу, вызывает химическую реакцию. Численно σ равно $1/D_{37}$, где D_{37} — доза, при которой 37% молекул остались неповрежденными.

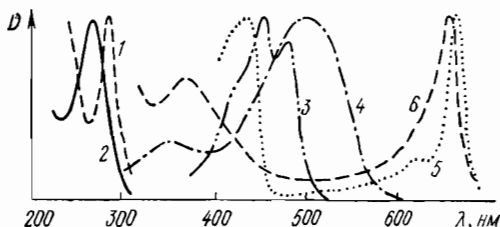


Рис. 7. Спектры поглощения биологически важных хромофоров: 1 — белок; 2 — ДНК; 3 — β -каротин; 4 — родопсин; 5 — хлорофилл а; 6 — фитохром

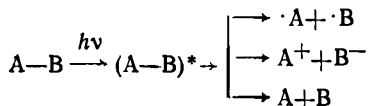
Вещество, ответственное за поглощение биологически активного света, выявляется с помощью метода спектров действия фотобиологических реакций, близких по смыслу к спектрам возбуждения люминесценции. Спектр действия представляет собой зависимость величины биологического эффекта от длины волны действующего света. С расчетом на одинаковое число падающих на объект квантов спектр действия фотобиологической реакции при отсутствии процессов миграции энергии совпадает по форме со спектром поглощения вещества, ответственного за реакцию.

В биологических системах представлены как хромофоры (рис. 7), выработанные в ходе эволюционного развития для улавливания и утилизации света (фотосинтетические пигменты, фитохром, родопсин), так и хромофоры, являющиеся участниками обычных метаболических реакций и вместе с тем способные претерпевать фотохимические превращения (белки, нуклеиновые кислоты, коферменты, витамины).

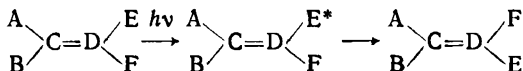
2. ТИПЫ ФОТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

Для фотобиологии в основном типичны одноквантовые фотохимические реакции молекул, находящихся в нижнем электронно-колебательном синглетном (флуоресцентном) или триплетном (фосфоресцентном) возбужденном состоянии. Известны следующие основные типы одноквантовых фотохимических реакций органических молекул.

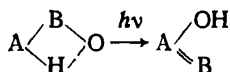
1. *Фотораспад*, при котором с разрывом химических связей происходит расщепление молекулы на радикалы, ионы или нейтральные более простые молекулы. Фотораспад наблюдается, например, при облучении большими дозами ультрафиолета аминокислот, пептидов и белков (фотолиз пептидной связи, дезаминирование, декарбоксилирование), а также нуклеотидов и нуклеиновых кислот:



2. *Фотоперегруппировки*, в ходе которых один изомер или таутомер превращается в другой. Если перегрупповываются отдельные атомы или группы в молекуле, говорят о реакции фотоизомеризации, частный случай которой — фотостереоизомеризация, заключающаяся в изменении пространственного расположения отдельных группировок в молекуле относительно ее «хребта»:



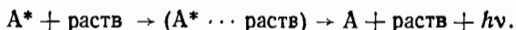
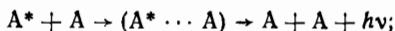
Фототаутомеризация — перенос атома водорода из одной части молекулы в другую:



Фотохимическая реакция *цис-транс*-изомеризации ретиналя (простетической группировки пигмента родопсина) лежит в основе такого общебиологического информационного процесса, как зрение беспозвоночных и позвоночных животных, а также человека.

3. *Фотоприсоединение* — присоединение к возбужденной молекуле других молекул. В зависимости от того, какая молекула присоединяется, различают фотодимеризацию ($A^* + A \rightarrow (A^* \dots A) \rightarrow A_2$), фотоокисдирование ($A^* + O_2 \rightarrow (A^* \dots O_2) \rightarrow OAO$) и фотогидратацию ($A^* + H_2O \rightarrow HAOH$).

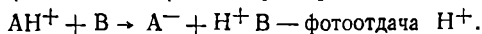
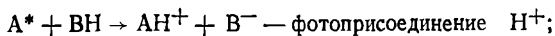
В качестве разновидности реакций фотоприсоединения можно рассматривать также образование димеров между возбужденной и невозбужденной молекулами (*эксимер*) и комплексов возбужденная молекула — растворитель (*эксиплекс*). Такие димеры или комплексы неустойчивы и самопроизвольно распадаются с испусканием кванта света:



Важнейшими реакциями фотоприсоединения в биологии являются реакции фотодимеризации тимина в растворе и ДНК, а также фотогидратации урацила в растворе и РНК.

4. *Фотоперенос электронов*, при котором возбужденная молекула отдает свой электрон второй, невозбужденной молекуле ($A^* + B \rightarrow A^+ + X^-$ — фотоокисление) или, наоборот, получает лишний электрон ($A^* + C \rightarrow A^- + C^+$ — фотовосстановление). Такие реакции становятся возможными благодаря изменению энергии ионизации молекулы и сродства к электрону при возбуждении. Продуктами реакций фотопереноса электрона являются сольватированные электроны, катион- и анион-радикалы. Важнейшие биологические реакции фотопереноса электронов — обратимое фотовосстановление хлорофилла при фотосинтезе и перенос электрона, образующегося при фотоионизации ароматических аминокислотных остатков в белке, к дисульфидным связям с последующим их восстановлением. Разновидность фотопереноса электронов — так называемые комплексы с переносом заряда. Здесь происходит переброс электрона от одной части комплекса к другой с образованием новой полосы поглощения, не характерной для электронной архитектуры каждой из этих частей, обладающих свойствами относительно автономных хромофоров.

5. *Фотоперенос протона.* Суть реакции — в присоединении к возбужденной молекуле протона от невозбужденной кислоты или, наоборот, — в отдаче возбужденной кислотой своего протона основанию:



В обоих случаях реакция обусловлена изменением протонодонорных или протонаакцепторных свойств возбужденных молекул.

Наиболее общей особенностью различных фотохимических реакций является их электронная природа: каждому из возникающих фотохимическим путем веществ предшествует изменение волновой функции фотоэлектрона. Таким образом, можно сказать, что *элементарный акт любой фотохимической реакции — это одноквантовый одноэлектронный процесс.*

В связи с этим не представляется удивительным тот факт, что промежуточным этапом многих фотохимических реакций является возникновение свободного радикала, т. е. осколка молекулы, несущего один неспаренный (химически активный) электрон на внешней орбите.

Одной из важнейших проблем фотохимии является соотносительная роль синглетных и триплетных электронно-возбужденных состояний. Химическая активность электронно-возбужденного состояния определяется тремя основными параметрами: запасом энергии, временем жизни и наличием реакционно-активных электронов на внешней орбите. Синглетное электронно-возбужденное состояние обладает большим запасом энергии, чем триплетное, что расширяет пределы его реакционной способности. С другой стороны, триплетное состояние обладает значительно большим временем жизни (до минут) и, что особенно важно, имеет на внешней орбите химически реакционно-способные неспаренные электроны.

Наконец, известно, что возбуждение многих органических молекул сопровождается изменением их кислотно-основных свойств. Так, например, синглетные электронно-возбужденные состояния ароматических соединений, как правило, имеют большую основность или кислотность, чем триплетные.

Каждый из перечисленных факторов не является

определяющим. В ходе эволюции, развития был сделан оптимальный выбор между синглетным и триплетным механизмами фотобиологической реакции. В конечном счете соотносительная роль синглетных и триплетных электронно-возбужденных состояний в фотобиологии определяется типом и характером каждой отдельной реакции.

Рекомендуемая литература

- Владимиров Ю. А. Фотохимия и люминесценция белков. М., 1965.
Калверт Дж., Питтс Дж. Фотохимия. М., 1968.
Молекулярная фотоника. Л., 1972.
Теренин А. Н. Фотоника молекул красителей. М.—Л., 1967.
Турро Н. Молекулярная фотохимия. М., 1967.
Элементарные фотопроцессы в молекулах. М., 1966.
McLagen A., Shugar D. Photochemistry of proteins and nucleic acids. Oxford, 1967.
The science of photobiology. N. Y., 1977.

Глава III. СИСТЕМАТИКА И ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ И ИХ ОСНОВНЫХ СТАДИЙ

Огромное количество фотобиологических процессов (рис. 8) может быть систематизировано как с энергетической, так и с биологической стороны. Если продукты фотобиологической реакции обладают большим, чем исходные вещества, запасом свободной энергии, то речь идет об *эндергонической* реакции (фотосинтез у растений и водорослей). Законсервированная энергия квантов света используется для покрытия энергетических нужд клеток и организмов. Основным биологический смысл этих реакций — превращение световой энергии в химическую с последующим запасанием ее впрок.

Однако большинство фотобиологических реакций — это реакции *экзергонические*, где энергия света, по существу, используется для преодоления активационного барьера химической реакции.

С биологической, функциональной, стороны фотобиологические реакции можно подразделить на собственно

физиологические и деструктивно-модифицирующие (см. схему).



Собственно физиологические, или функционально-физиологические, реакции, в которых продукты, или интермедиаты, необходимые для выполнения ряда естественных функций клетки или организма, образуются только под действием света. К этому же типу относятся и фотореакции, при которых в клетке возникают специфические молекулы, не являющиеся интермедиатами метаболизма или ферментами, а выступающие в роли естественных эффективных регуляторов биологических процессов. В этих случаях эволюционное развитие предусмотрело, чтобы определенные стадии сложной сети процессов обмена веществ и энергии осуществлялись под действием света. Как правило, для этой цели выработаны и оформлены специализированные молекулы, ответственные за улавливание биологически активного света,— пигменты.

Функционально-физиологические реакции, в свою очередь, разделяются на энергетические, информационные и биосинтетические.

В ходе энергетических реакций световая энергия в результате синтеза новых органических молекул трансформируется в химическую. При этом суммарная свободная энергия конечных продуктов реакции выше, чем у

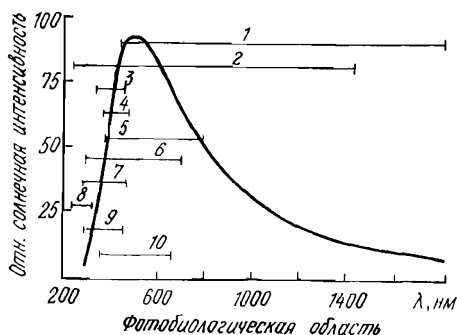


Рис. 8. Спектр фотобиологических процессов:

1 — темновая химия (энергия активации); 2 — фотохимия; 3 — фотореактивация; 4 — фототропизм; 5 — фотосинтез; 6 — пигментное потемнение; 7 — меланогенез; 8 — эритема; 9 — кожная фотосенсибилизация; 10 — зрение

исходных. Основная энергетическая реакция — фотосинтез, в результате которого из воды и углекислого газа за счет энергии света синтезируется глюкоза. Фотосинтез включает в себя образование богатых энергией промежуточных продуктов, например, АТФ и восстановленный НАДФ. Возникновение каждого из промежуточных продуктов фотосинтеза может рассматриваться как самостоятельная эндоэргоническая фотобиологическая реакция. Пигменты (хлорофилл, бактериохлорофилл и др.), непосредственно улавливающие световую энергию при фотосинтезе, не расходуются, а играют роль фотокатализатора биохимических превращений. Особой разновидностью фотосинтеза является светозависимое образование АТФ с участием бактериородопсина у галофильных бактерий.

При информационных реакциях свет через образование фотопродуктов триггирует специализированные усилительные механизмы, в результате чего организм получает необходимую информацию о ситуации в окружающей среде. Отличительный признак этой группы

реакций — сложная конструкция усилительного аппарата, достигающая самой высокой степени совершенства в органе зрения. Один квант света, попавший в рецепторную клетку сетчатки, вызывает передвижение огромного количества ионов, формирующих зрительный сигнал (усиление по мощности 10^5 — 10^6). Как и при энергетических реакциях, пигмент, поглощающий свет, практически не расходуется, поскольку его фотопревращения обратимы. К этой группе реакций можно отнести также таксисы, тропизмы, периодизмы, морфогенетические реакции.

При *биосинтетических* реакциях в сложной цепи последовательных этапов синтеза органических молекул представлены отдельные фотохимические стадии, т. е. химические реакции, в норме протекающие только под действием света. Например, выращенные в темноте растения не обладают характерной для них зеленой окраской. В них не синтезируется хлорофилл. Большинство стадий биосинтеза хлорофилла не нуждается в свете, однако одна из заключительных стадий — превращение протохлорофиллида в хлорофиллид — представляет собой фотохимическую реакцию. Сходным образом провитамины D, накапливаемые без участия света, превращаются в витамин фотохимическим путем. Характерно, что в реакциях этого типа акцептором биологически активного света является сам предшественник пигмента или витамина. Известны, однако, и такие биосинтетические реакции, в которых свет поглощается другими хромофорами, например, флавинами или цитохромами, как в случае биосинтеза каротиноидов. При этом биосинтез пигмента стимулируется косвенным образом через активацию соответствующих ферментных систем (индукция синтеза специфических белков).

Как при информационных, так и при биосинтетических реакциях существенного запаса энергии не происходит. Общим для всех функционально-физиологических реакций является отсутствие повреждений жизненно важных макромолекулярных и надмолекулярных структур клетки. Наоборот, в ряде случаев их протекание приводит к образованию структурных элементов. Например, активный для биосинтеза хлорофилла свет, превращающий этиолированные проростки растений в зеленые,

способствует формированию мембранной (ламеллярной) системы хлоропласта.

В противоположность функционально-физиологическим при *деструктивно-модифицирующих* реакциях свет и электронно-возбужденные состояния молекул не являются естественными участниками нормальных метаболических процессов. Свет просто повреждает готовые молекулы биосубстрата, побуждая их к различным химическим превращениям, часто не свойственным норме. Деструктивно-модифицирующие реакции разделяются на отдельные классы реакций: летальные, мутационные и патофизиологические.

Летальные реакции, приводящие к гибели организма, вызываются в основном ультрафиолетовым светом. Гибель организма наступает вследствие фотохимических повреждений биологически важных макромолекул и прежде всего ДНК. Эти же соединения являются акцепторами повреждающего света. Летальные эффекты наблюдаются у низкоорганизованных форм живой материи: животных, растительных и бактериальных вирусов (фагов), микроорганизмов, простейших. В случае микроорганизмов различают бактериостатический (клетки живут, но не размножаются) и бактерицидный (клетки гибнут) эффекты. Естественно, что гибель организмов может быть вызвана очень интенсивным видимым светом (лазеры). Однако в этом случае преобладает не фотохимический, а тепловой эффект.

Особой разновидностью летальных реакций представляется так называемый фотодинамический эффект, когда искусственно внесенная в клетку краска сенсibilизирует организм к видимому свету в присутствии кислорода.

Мутационные реакции по своей природе близки к летальным. Результат действия УФ-света — замена или выпадение основания в ДНК, т. е. возникновение мутантной формы организма. Подобно летальным, мутационные реакции возникают и при фотодинамическом действии видимого света.

К летальным и мутационным реакциям по своему механизму близки вызываемые ультрафиолетовым светом процессы рекомбинации бактерий и индукции профага в них.

Патофизиологические реакции приводят к временным

нарушениям метаболизма и физиологического состояния клеток и организмов. В ходе этих реакций не происходит необратимого повреждения уникальных, критических, жизненно важных структур. Патофизиологические реакции развиваются после поглощения света различными хромофорами: белками, нуклеиновыми кислотами, липидами, витаминами и др. К патофизиологическим реакциям примыкают и некоторые фотобиологические процессы, протекающие в коже, например, эритема, эдема и канцерогенез.

Особенностью деструктивно-модифицирующих реакций является отсутствие специальных усилительных механизмов первичного фотохимического повреждения. Более того, реакциям первых двух классов свойственны антиусилительные механизмы, связанные с работой ферментных систем репарации и фотореактивации. Конечный биологический эффект может быть связан как с гибелью исходных молекул, так и со свойствами фотохимических продуктов, которые в ряде случаев являются не только токсинами, но и стимуляторами или модификаторами (мутации в ДНК) жизненных процессов. Поэтому наряду с основным результатом такого рода физиологических реакций — повреждением или гибелью клетки (организма) — наблюдаются и эффекты противоположного рода — стимуляция и (или) модификация жизненных процессов.

Как уже отмечалось, большинство реакций, вызываемых ультрафиолетовым светом, относится к деструктивно-повреждающим. Однако и видимый свет в ряде случаев способен к аналогичному действию: фотодинамический эффект, большие (лазерные) интенсивности света.

Несмотря на большое разнообразие фотобиологических реакций, все они характеризуются более или менее единообразной последовательностью стадий: 1) фотофизическая, включающая поглощение света биологически активным хромофором (акцептором), т. е. молекулой, от которой начинается цепь событий, приводящих к биологическому макроэффекту: образование электронно-возбужденных франк-кондоновских состояний, внутримолекулярные процессы нераспределения энергии, межмолекулярные процессы миграции энергии; 2) стадия

первичной фотохимии, в ходе которой образуется исходный фотопродукт, непосредственно участвующий в дальнейших химических или физико-химических превращениях; 3) стадия вторичной фотохимии, когда первичный фотопродукт, претерпевая спонтанные химические превращения (чаще всего с участием ближайших молекулярных соседей), преобразуется в стабильный, под которым подразумевается соединение, само по себе (в изолированном состоянии) устойчивое в течение достаточно длительных промежутков времени; 4) стадия темновых превращений, которая начинается со стабильных фотопродуктов и включает цепь биохимических (ферментативных) реакций или конформационных перестроек надмолекулярных структур и прежде всего биологических мембран; 5) конечный биологический макроэффект, развивающийся вследствие биохимических и структурных изменений, в результате которых происходят биологически значимые события: синтез богатых энергией веществ, движение биообъекта, модификация генотипа и физиологических функций и т. д.

Таким образом, при всем своем разнообразии фото-биологические реакции характеризуются внутренним единством наиболее общих механизмов и затрагивают жизненно важные функции деятельности живых организмов.

Глава IV. ФОТОСИНТЕЗ

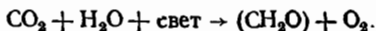
Внешняя энергия для всех жизненных процессов на Земле черпается из двух источников: *химической энергии* неорганических веществ (земной источник) и *энергии света* (космический источник). В первом случае используется свободная энергия, выделяемая при окислении неорганических веществ (например, $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$) и запасаемая при хемосинтезе некоторыми микроорганизмами: железобактериями, серобактериями и т. д.

Неизмеримо большее значение для жизни имеет свободная энергия, накапливаемая растениями и микроорганизмами при фотосинтезе, когда световая энергия Солнца трансформируется в химическую энергию органических молекул. В минуту на поверхность Земли падает энергия

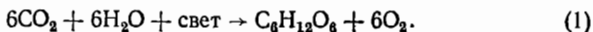
в $5 \cdot 10^{20}$ ккал. Около 2% этой энергии поглощается фотосинтезирующими организмами (10^{19} ккал). В пределах 30% поглощенной световой энергии трансформируется в стабильную химическую энергию органических веществ (коэффициент полезного действия фотосинтеза около 30%). За счет фотосинтеза ежегодно синтезируется на Земле в пересчете на углерод приблизительно $5 \cdot 10^{10}$ т органического вещества. При этом поглощается $2 \cdot 10^{12}$ т CO_2 и выделяется в атмосферу $13 \cdot 10^{10}$ т молекулярного кислорода.

1. ИТОГОВАЯ РЕАКЦИЯ ФОТОСИНТЕЗА

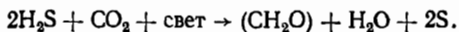
Суть фотосинтеза — в восстановлении углекислого газа до углеводов за счет энергии поглощаемого растением света. Для всех растений и многих фотосинтезирующих микроорганизмов источником водорода при синтезе органических молекул служит вода. Итоговая реакция фотосинтеза выглядит так:



Естественно, что для синтеза одной молекулы глюкозы понадобится по шесть молекул CO_2 и H_2O :

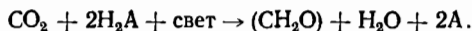


Выделяющийся в результате фотолиза воды кислород — основной, если не единственный, фактор формирования земной атмосферы и поддержания в ней кислородного баланса. Однако не всегда фотосинтез сопровождается выделением кислорода. Не выделяют кислород микроорганизмы, у которых в качестве донора водорода выступает не вода, а другие водородсодержащие вещества: эфиры органических кислот, сами кислоты, вторичные спирты, неорганические соединения серы или даже молекулярный водород:



Последняя реакция характерна для некоторых фотосинтезирующих бактерий, например, пурпурных и зеленых серобактерий.

Таким образом, в наиболее общем виде итоговая реакция фотосинтеза выглядит так:

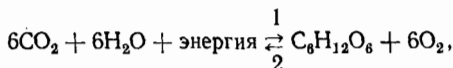


В дальнейшем основное внимание будет уделено наиболее универсальному «кислородному» фотосинтезу, поскольку механизмы важнейших этапов процесса для всех организмов, видимо, близки. Рассмотрим прежде всего фотосинтез с точки зрения термодинамики.

2. ТЕРМОДИНАМИКА ФОТОСИНТЕЗА

Если не принимать в расчет потерю энергии квантов света, с чисто химической точки зрения «изолированная» от внешней среды реакция фотосинтеза представляет собой типичную эндоэргоническую и эндотермическую реакцию, идущую с увеличением запасов свободной энергии и энтальпии. Так, для реакции (1) $\Delta F \approx 115$, а $\Delta H \approx 112$ ккал/моль. Из общеизвестного соотношения между изменением общей внутренней энергии системы (ΔH — энтальпия), свободной (ΔF) и связанной ($T\Delta S$, где ΔS — изменение энтропии) энергий $\Delta H = T\Delta S + \Delta F$ следует, что фотосинтез сопровождается некоторым уменьшением запасов связанной энергии, а следовательно, и энтропии. Это вполне понятно, поскольку продукты фотосинтеза (глюкоза и кислород) имеют меньшее число степеней свободы для различных форм движения (большую упорядоченность), чем исходные продукты (вода и углекислота).

Формально реакция фотосинтеза представляет собой обращенную реакцию полного окисления глюкозы:



где 1 — фотосинтез ($\Delta F = +686$ ккал/моль, $\Delta H = +673$ ккал/моль, $\Delta S = -43,6$ кал/моль·град); 2 — дыхание ($\Delta F = -686$ ккал/моль, $\Delta H = -673$ ккал/моль, $\Delta S = +43,6$ кал/моль·град).

Иначе обстоит дело, если рассматривать фотосинтетическую систему как открытую, учитывая «исчезновение»

квантов света, что и имеет место в действительности. В этом случае запасы свободной энергии системы $h\nu + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ больше, а ее энтропия меньше, чем у системы глюкоза + кислород. Только без учета энергии света создается впечатление, что химическая реакция идет против термодинамического потенциала (первого и второго законов термодинамики). Энергия квантов света расходуется, с одной стороны, на замену *суммарно более прочных ковалентных связей* (в CO_2 и H_2O) на *суммарно менее прочные связи* (в $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ и O_2) и, с другой стороны, на *упорядочение системы*.

Подсчитаем энергию связей для исходных и конечных продуктов фотосинтеза. В исходных продуктах CO_2 и H_2O содержатся две $\text{C}=\text{O}$ -связи (190 ккал/моль) и две $\text{O}-\text{H}$ -связи (110 ккал/моль). Итого: $190 \cdot 2 + 110 \cdot 2 = 600$ ккал/моль. В конечных продуктах CH_2O и O_2 содержатся одна $\text{O}=\text{O}$ -связь (116 ккал/моль), одна $\text{C}=\text{O}$ -связь (190 ккал/моль) и две $\text{C}-\text{H}$ -связи (92 ккал/моль). Итого: $116 + 190 + 92 \cdot 2 = 490$ ккал/моль. Следовательно, дефицит энергии валентных связей составляет 110 ккал.

Ту же величину можно получить из оценки окислительно-восстановительных потенциалов. В итоговой реакции фотосинтеза (1) представлены две сопряженные между собой окислительно-восстановительные полуреакции: окисление воды и восстановление углекислоты. Первая полуреакция ($2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{H}^+ + 4\bar{e} \rightarrow \text{O}_2$) имеет редокс-потенциал (E_h) $+0,8$ В, вторая ($\text{CO}_2 + 4\text{H}^+ + 4\bar{e} \rightarrow \text{CH}_2\text{O}$) $-0,4$ В. Отсюда общая разность потенциалов 1,2 В. Для переноса четырех электронов требуется энергия $E = eV = 4e \cdot 1,2 \text{ В} = 4,8 \text{ эВ}$, или 112 ккал/моль.

Следовательно, при фотосинтезе энергия квантов света тратится, по существу, на ослабление связей, т. е. на подъем «среднего» валентного электрона на более высокий энергетический уровень. Электрон обогащается энергией — переход «холодный» → «горячий» электрон. Образно говоря, фотосинтез — это *электронный насос, работающий на энергии света*.

3. КВАНТОВЫЙ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ВЫХОД ФОТОСИНТЕЗА

Для покрытия энергетических затрат, связанных с осуществлением реакции (1), теоретически достаточно трех квантов красного света (1 эйиштейн для 680 им соответствует примерно 40 ккал). Однако в реальных условиях требуется бо́льшая энергия. Обычно в литературе используется понятие *квантового расхода* (величина, обратная квантовому выходу), который определяется количеством квантов, необходимых для образования тех или иных продуктов фотосинтеза. Минимальное определенное в эксперименте значение квантового расхода на образование одной молекулы O_2 колеблется, по данным различных авторов, от 4 до 12. Наиболее корректные и прецизионные определения последних лет дают величину $8h\nu$ и для фотосинтетиков, использующих в качестве донора водорода воду, и для микроорганизмов с иными донорами водорода.

Простой расчет показывает, что коэффициент полезного действия трансформации световая $\rightarrow$ химическая форма энергии

$$\eta = \frac{120 \text{ ккал} \cdot 100}{40 \text{ ккал} \cdot 8} = 37 \%$$

приведенная эффективность фотосинтеза отражает, однако, его максимально достижимый уровень. При неблагоприятных условиях (освещенность, температура, влажность и т. д.) квантовый расход фотосинтеза может увеличиваться в десятки, сотни и т. д. раз, вплоть до бесконечности (свет поглощается — фотосинтеза нет). Верхний предел эффективности фотосинтеза связан с неизбежными энергетическими потерями в ходе фотофизических (диссипация энергии в тепло) или фотохимических стадий, а также многочисленных (более ста) промежуточных химических реакций, каждая из которых катализируется своим специфическим ферментом.

С другой стороны, умеренные значения коэффициента полезного действия, т. е. существование известного перепада в энергии, содержащейся в начальных (CO_2 , H_2O , $h\nu$) и конечных (CH_2O , O_2) продуктах, приводят к высоким направленным скоростям суммарного процесса (при

$\Delta F = 0$ никакой физической или химической процесс вообще не идет, для обратимой химической реакции наступает состояние динамического равновесия, когда скорости прямой и обратной реакций равны между собой).

Итак, основной биологический смысл фотосинтеза — *извлечение свободной энергии из окружающей среды и накопление ее в виде стабильных органических молекул. Только свет делает возможной явно эндергоническую реакцию синтеза углеводов из воды и углекислоты. Запасенная световая энергия используется в дальнейшем всеми автотрофными и гетеротрофными организмами при выполнении ими всех биологических функций.*

Коротко рассмотрим структурную организацию фотосинтетического аппарата, затем перейдем к внутренним механизмам фотосинтеза — сложной цепи реакций, которые целесообразно расчленим на четыре участка: фотофизический, фотохимический, электронно-транспортный и чисто биохимический.

4. СТРУКТУРА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА

Как правило, фотосинтез осуществляется в цитоплазматических органеллах растений — хлоропластах, число которых в клетке варьирует у различных видов фотосинтезирующих организмов от одного до нескольких тысяч (у сине-зеленых водорослей фотосинтез осуществляется в мембранной системе, не организованной в виде хлоропластов). Хлоропласты высших растений имеют форму эллипсоидов вращения с длинной осью 5—10 мкм. Они могут быть также сферическими, яйцевидными или дисковидными. Более полиморфны хлоропласты водорослей, представляющие собой иногда длинные перекрученные полосы или звездоподобные тельца.

Хлоропласты (рис. 9) отделены от содержимого клетки мембраной ($d \approx 100 \text{ \AA}$). Мембраны, локализованные внутри хлоропласта, получили название *ламелл* (двойная мембрана). В отдельных местах хлоропласта ламеллы, плотно расположенные одна под другой («пачки»), формируют *граны*, которые наблюдаются далеко не у всех организмов. Ламеллы располагаются в хлоропласте более или менее параллельно друг другу и имеют различ-

ную протяженность. Отдельные ламеллы пронизывают весь хлоропласт. На участках между гранами они называются *фретами* (ламеллами стромы). Другие, более короткие ламеллы не выходят за пределы гран (ламеллы гран). Двойная мембрана в хлоропласте замкнута сама на себя и образует около 1000 уплощенных компартментов, получивших название *тилакоидов* (от греческого

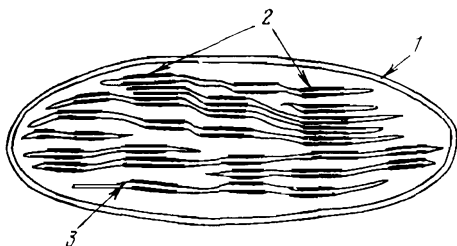


Рис. 9. Строение хлоропласта (по Веттштейну):

1 — двойная мембрана (ламелла); 2 — граны; 3 — тилакоиды

tilax — мешковидный). Это двойное плоское замкнутое мембранное образование с полостью внутри, имеющее диаметр порядка 5000 Å. Тилакоиды образуются в результате втягивания (инвагинации) внутренней, окружающей хлоропласт двойной мембраны.

Содержимое хлоропласта, остающееся после удаления ламеллярной системы, называется *стромой* (или *матриксом*) хлоропластов. Матрикс имеет мелкозернистое строение. В ламеллярной системе протекают фотофизические, фотохимические и электронно-транспортные стадии фотосинтеза. В строме осуществляются некоторые темновые ферментативные реакции, связанные с фиксацией CO_2 .

Как и другие цитоплазматические мембраны, мембраны хлоропластов состоят в основном из упорядоченно расположенных белков и липидов, среди которых особое место в стабилизации мембраны занимают фосфолипиды, имеющие полярные и неполярные группировки.

Фотосинтетические пигменты и прежде всего хлорофилл ассоциированы с мембранами и так или иначе взаимодействуют с белками и липидами, образуя хлорофилл-белок-липидные комплексы. Подсчитано, что в мем-

бране тилакоида содержится около 10^5 молекул пигмента. Из хлоропластов удалось выделить устойчивые комплексы хлорофилловых пигментов и каротиноидов с белком-носителем (протохлорофиллид-, хлорофиллид-, хлорофилл-голохромы). Некоторые авторы оценивают в структуре хлоропласта даже углы между плоскостью форбинового кольца и поверхностью мембраны, а также характер взаимоориентации и упаковки в ней пигментов, липидов и белков, хотя точные сведения о стереометрии мембран еще не получены.

Под электронным микроскопом у мембран хлоропластов обнаруживаются периоды регулярности, что указывает на субъединичный характер их строения. Предполагается, что мембраны хлоропластов построены из агрегатов — глобулярных липопротеиновых субъединиц. Молекулы белка, липида и пигментов стабилизируются прежде всего с помощью гидрофобных взаимодействий.

Наличие в мембранах хлоропластов агрегатов глобулярных субъединиц подтверждается также и данными электронно-микроскопической криофрактографии. По данным Парка, такие частицы особенно хорошо проявляются на плазматической поверхности скола мембраны тилакоида в виде возвышений (диаметр порядка $175 \text{ \AA}$). Сходные комплексы, состоящие из четырех субъединиц, но имеющие меньший диаметр (около $120 \text{ \AA}$), описаны Мюлеталером.

В последние годы предприняты попытки выделить различные субъединичные комплексы из дезинтегрированных детергентами мембран хлоропластов. Используя метод электрофореза, Л. И. Фрадкин выделил из обработанного дигитонином мембранного материала дискретный набор субмембранных частиц, имеющих размер порядка $120\text{--}150 \text{ \AA}$ и молекулярную массу примерно $1\text{--}2$ млн. Структура, количество частиц и содержание в них хлорофилла зависели от вида растения, условий его выращивания и стадии развития хлоропласта. Характерно, что эти структурные элементы проявляли активность частных реакций фотосинтеза.

Фотосинтетические органоиды бактерий получили название *хроматофоров*. Хроматофоры имеют форму тру-

бочек, пузырьков или дисков с максимальным размером до 30 Å. По внутреннему строению хроматофоры близки к хлоропластам. Как и хлоропласты, они имеют мембранное, субъединичное строение.

Из мембран *Rhodospirillum rubrum* удалось выделить дискретные структурные единицы, в состав которых входит 40 молекул бактериохлорофилла, 20 молекул каротиноидов и белок ($M=1\,000\,000$). Единица построена, в свою очередь, из четырех — восьми субъединиц, каждая из которых содержит одну молекулу химически активного бактериохлорофилла (ловушка). Характерно, что свет индуцирует в этих единицах такие же изменения поглощения и ЭПР-сигнала, как и у самих бактерий. Это свидетельствует об их фотофизической и фотохимической активности.

Таким образом, фотосинтез является функцией сложно организованного мембранного аппарата, многие детали устройства которого до сих пор не выяснены.

5. ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СТАДИИ ФОТОСИНТЕЗА

Как и другие фотобиологические реакции, фотосинтез начинается с поглощения кванта света специализированными хромофорами, которые можно подразделить на три основные группы (табл. 3, 4): хлорофиллы, каротиноиды, фикобилины. Роль этих пигментов как акцепторов света доказывается многочисленными измерениями спектров действия фотосинтеза.

Наибольшее значение в фотосинтезе играют хлорофиллы, главным образом хлорофилл *a*.

Хлорофилл *a* состоит из «головки» (замкнутое через метинные мостики тетрапиррольное форбиновое кольцо) и «хвоста» (многоатомный спирт фитол). В центре молекулы находится магний, соединенный координационными связями с атомами азота каждого из четырех пиррольных колец. Все остальные хлорофиллы (*b*, *c*, *d*, *e*, бактериохлорофиллы *a*, *b*, *c*, *d*) отличаются по структуре от хлорофилла *a* тремя признаками: 1) строением «хвоста» (у хлорофилла *c* он отсутствует); 2) заменой заместителей в форбиновом кольце (у хлорофилла *b* во втором пиррольном кольце метильная группа замещается на альдегидную); 3) числом или распределением двойных связей

Таблица 3. Спектральные свойства хлорофиллов

Пигмент	Положение максимумов спектра поглощения, нм		Где встречается
	в органических растворителях	в клетке	
Хлорофилл <i>a</i>	430 (420), 660 (662)	435, 661—710 (несколько форм)	Во всех фотосинтетических организмах, исключая бактерии
Хлорофилл <i>b</i>	453, 643 (642)	480, 650	В высших растениях и зеленых водорослях
Хлорофилл <i>c</i>	445 (441), 625 (626)	Красная полоса (645)	В диатомовых и бурых водорослях
Хлорофилл <i>d</i>	450 (447), 690 (688)	Красная полоса (740)	В некоторых красных водорослях
Бактериовидин	Две формы: I—425, 650, II—432, 660	Красная полоса (750 или 760)	В зеленых бактериях
Бактериохлорофилл <i>a</i>	365 (358), 605, 770 (773)	Красные полосы (800, 870, 890)	В пурпурных и зеленых бактериях
Бактериохлорофилл <i>b</i>	368, 582, 795	Красная полоса (1017)	В штаммах <i>Rhodospseudomonas</i> (пурпурные бактерии)

в кольцевой системе. Для бактериохлорофилла характерно расположение гидрированных пиррольных колец, противоположное тому, которое свойственно хлорофиллу.

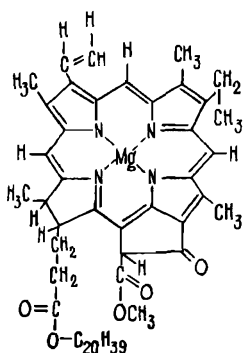
Все хлорофиллы интенсивно поглощают видимый свет. В спектрах поглощения хлорофиллов заметны четыре полосы: три в красно-желтой и одна в синей области. Наиболее интенсивная коротковолновая полоса называется полосой Соре. Она характерна для всех порфиринов, представляющих собой замкнутую тетрапиррольную систему с сопряженными двойными связями. Спектральные характеристики хлорофилловых пигментов представлены в табл. 3 и на рис. 10. В первом приближении максимумы в красно-желтой области спектра формируются сложной комбинацией двух электронно-колебательных

Таблица 4. Спектральные свойства важнейших каротиноидов (каротины, каротенолы) и фикобилинов

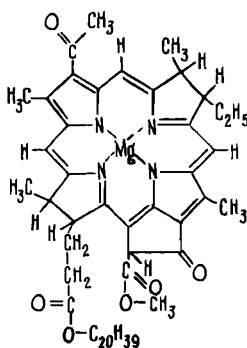
Пигмент	Среда	Положение максимумов спектра поглощения, нм	Где встречается
<i>Каротины</i>			
α -Каротин	Гексан	420, 440, 470	В высших растениях и некоторых водорослях
β -Каротин	»	425, 450, 480	Во всех растениях
γ -Каротин	»	440, 460, 495	В зеленых серусодержащих бактериях
<i>Каротенолы (ксантофиллы)</i>			
Лютеин	Этанол	425, 445, 475	В зеленых листьях, зеленых и красных водорослях
Виолаксантин	»	425, 450, 475	В зеленых листьях высших растений
Фукоксантин	Гексан	425, 450, 475	В диатомовых и бурых водорослях
Спириллоксантин	»	464, 490, 524	В пурпурных бактериях
<i>Фикобилины</i>			
Фикоэритрин	Вода и клетка	490, 546, 565	В красных и некоторых сине-зеленых водорослях
Фикоцианин	Вода и клетка	618	В сине-зеленых и красных водорослях
Аллофикоцианин	Фосфатный буфер, pH=6,5	654	В сине-зеленых и красных водорослях

π — π^* -переходов. Два электронных π — π^* -перехода ответственны также за образование полосы Core.

Все хлорофилловые пигменты обладают интенсивной флуоресценцией в малополярных растворителях: хлорофилл *a* в серном эфире имеет максимумы флуоресценции при 663 и 720 нм. Обе полосы флуоресценции хлорофилла



Хлорофилл а



Бактериохлорофилл а

обусловлены одним и тем же электронным переходом, причем первому максимуму соответствует линейный, второму — плоский осциллятор, обладающий одинаковыми составляющими по двум взаимно перпендикулярным направлениям в плоскости молекулы.

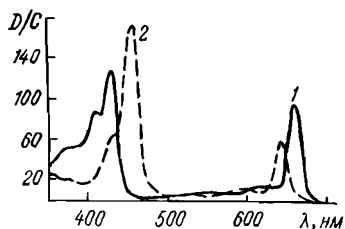


Рис. 10. Спектры поглощения хлорофиллов а(1) и b(2) в эфире (French C., 1962):

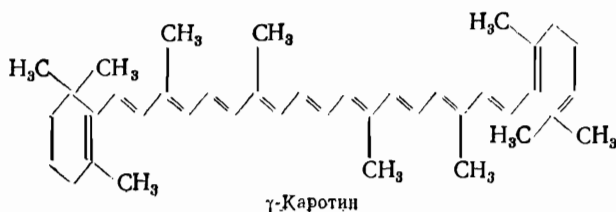
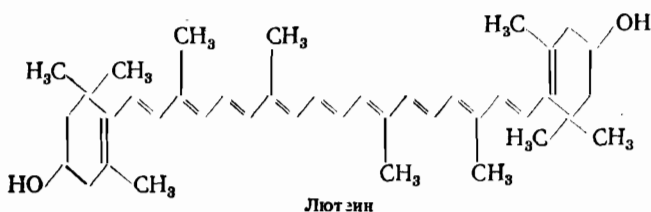
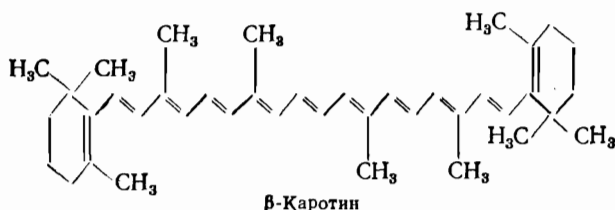
D/C — удельный коэффициент поглощения (C — концентрация, г/л)

В последние годы обнаружена низкотемпературная (-196°C) фосфоресценция хлорофиллов а и b (моносольваты, дисольваты, мономерные и агрегированные формы) в различных растворителях. Фосфоресценция характеризуется максимумами в области 890—1000 нм и временами жизни 1—4,3 мс.

Кроме того, об активности триплетных состояний хлорофилловых пигментов свидетельствуют: 1) замедленная флуоресценция, связанная как с аннигиляцией триплетных молекул при соударениях, так и с внутримолекулярным термоиндуцированным триплет-синглетным переходом, 2) сенсibilизированная триплетным состоянием люминесценция возбужденного синглетного кислорода с максимумом свечения при 1270 нм.

Каротиноиды построены из линейно соединенных друг с другом изопреновых единиц $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$. К концам полиизопреновой цепи у многих каротиноидов присоединены ароматические иононовые группировки. Как правило, молекула каротиноидов состоит из восьми изопреновых единиц и включает в себя 40 углеродных атомов.

Каротиноиды бывают ациклические, моноциклические (одно шестиуглеродное кольцо на конце линейной цепи) и бициклические (два шестиуглеродных кольца на каждом из концов линейной цепи). Различают α -иононовые и β -иононовые кольца. Каротиноиды подразделяются на каротины (α , β , γ) и каротинолы, или ксантофиллы (лютеин, виолаксантин, фукоксантин, спириллоксантин). Основной каротиноид зеленых растений — β -каротин. Положение длинноволновой полосы каротиноидов создает условия для поглощения фотосинтетиками синего света (400—500 нм).





Фикобилины, содержащиеся в сине-зеленых и красных водорослях, по строению отличаются от других пигментов фотосинтезирующих организмов. Известны три вида фикобилинов: фикоэритрин, фикоцианин и аллофикоцианин. В противоположность пигментам первых двух классов фикобилины представляют собой макромолекулы — хромопротеиды, состоящие из специфических белков и прочно связанных с ними ковалентными связями хромофорных групп. Молекулярный вес хромопротеидов порядка 300 000. Белковый носитель состоит, по крайней мере, из шести субъединиц. Простетическая группа хромопротеида — незамкнутая тетрапиррольная цепь, аналог желчных кислот.

Наиболее вероятно, что в состав фикоэритрина входит мезобилиродин, а в состав фикоцианина — мезобиливиолин. Каждая макромолекула фикобилина содержит несколько одинаковых хромофорных группировок. Длинноволновые полосы поглощения фикобилинов расположены в желто-оранжевой области (рис. 11). Судя по поляризационным спектрам флуоресценции, три длинноволновые полосы поглощения фикобилинов относятся к одному электронному переходу.

Для фикобилиновых пигментов характерен большой коэффициент экстинкции (порядка 10^5) и высокий квантовый выход флуоресценции (около 0,9). Следует отметить, что хромофорные группировки, отделенные от носи-

теля, резко изменяют спектр поглощения и утрачивают способность к флуоресценции.

Спектры поглощения фотосинтетических пигментов в клетках зеленых растений сдвинуты в длинноволновую область по сравнению с таковыми для растворов в органических растворителях. Это указывает на интенсивный характер взаимодействия пигмент — микроокружение. По-видимому, особо важную роль играют пигмент-белковые, пигмент-липидные и пигмент-пигментные слабые физико-химические взаимодействия.

В различных растительных и микробных организмах встречаются всевозможные комбинации пигментов. Однако во всех случаях обязательно присутствие хлорофилла *a* (или бактериохлорофилла *a*), через который и реализуется первичное фотохимическое действие света. Поэтому все пигменты фотосинтезирующих организмов разделяются на *основные* (хлорофилл *a* и бактериохлорофилл *a*) и *дополнительные* (каротиноиды, фикобилины и все остальные хлорофиллы). Большой арсенал дополнительных пигментов, перекрывающих своим поглощением практически весь «видимый» и часть ближнего инфракрасного спектра, позволяет фотосинтетикам активно улавливать падающую на Землю световую радиацию, которая исходит от ближайшего к ней галактического тела — Солнца.

В хлоропласте листа пигменты-светосборщики, активные формы хлорофилла *a* и ферменты, катализирующие темновые реакции, объединены в единую систему — *фотосинтетическую единицу*. В аналогичные единицы организован и фотосинтетический аппарат микроорганизмов. К мысли о существовании фотосинтетических единиц привели следующие неоднократно подтвержденные наблюдения.

1. Отсутствие латентного периода в появлении конеч-

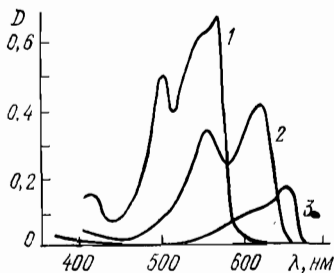


Рис. 11. Спектры поглощения фикоэритрина (1), фикоксианина (2) и аллофикоксианина (3) (Нахо F. et al., 1955)

ных продуктов фотосинтеза. При освещении растения светом такой интенсивности, при которой интервал времени между последовательными актами поглощения одной определенной молекулой хлорофилла составляет 10 мин, следовало бы ожидать проявления не менее 40-минутного индукционного периода (поскольку для выделения одной молекулы кислорода нужно поглощение минимум четырех квантов света).

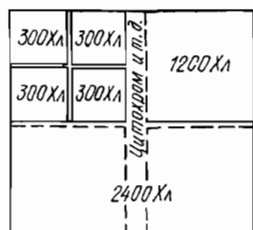


Рис. 12. Модель фотосинтетической единицы (Schmid G., Gaffron H., 1971)

Однако в эксперименте кислород выделяется практически сразу после освещения листа кратковременной вспышкой света.

2. Эффект насыщения фотосинтеза. При увеличении интенсивности света скорость фотосинтеза возрастает только до определенного порога. Изменяя продолжительность темновых интервалов при использовании насыщающего импульсного освещения, можно определить длительность работы темнового аппарата. Тогда можно подобрать такую интенсив-

ность и время насыщающей вспышки, при которых все молекулы хлорофилла, непосредственно связанные с темновым аппаратом, будут однократно загружены (не работают дважды) и каждая из них будет инициировать образование одной молекулы промежуточного стабильного продукта. С учетом квантового расхода фотосинтеза по числу молекул конечного продукта (число выделенных молекул O_2 или поглощенных молекул CO_2) можно рассчитать число фотохимически активных молекул хлорофилла, сопряженных с темновыми реакциями. Таким способом было рассчитано, что в фотосинтетическом аппарате на каждую активную молекулу хлорофилла приходится (по данным Эмерсона и Арнольда) 2400 молекул фотохимически неактивного хлорофилла. По более поздним данным Шмида и Гаффрона, количество неактивных молекул хлорофилла в фотосинтетической единице в зависимости от физиологического состояния и освещения равно 300, 600, 1200, 2400, 4800 (рис. 12).

Таким образом, фотосинтетическая единица представляет собой структурно-функциональное образование, ло-

кализованное в мембранной системе хлоропластов, в котором большое число молекул-светосборщиков работает на фотохимически активный хлорофилл как энергетическую ловушку. Только хлорофилл запускает цепь темновых реакций, ведущих к образованию конечных продуктов фотосинтеза.

Передача энергии в системе пигменты-светосборщики — фотохимически активный хлорофилл осуществляется с помощью миграционных механизмов. Фотофизическая стадия фотосинтеза включает миграцию энергии как между *однородными*, так и между *разнородными молекулами пигментов*. Оценка ее эффективности произведена в 1952 г. Дюйсенсом, а также независимо от него Френчем и Янг. В дальнейшем удалось выявить миграцию энергии между следующими партнерами: каротиноиды → фикоэритрин → фикоцианин → хлорофилл, хлорофилл *b* → хлорофилл *a*, хлорофилл *a* → хлорофилл *a*, каротиноиды → бактериохлорофилл *a*. В первой цепи возможна миграция от каждого из партнеров прямо к хлорофиллу *a*.

В настоящее время твердо установлена гетерогенность хлорофилла и бактериохлорофилла в клетке, т. е. спектральная дискретность химически тождественных молекул пигментов, обусловленная различиями в характере и интенсивности взаимодействия пигмент — микроокружение. Формы хлорофилла различаются по расположению электронно-колебательных уровней, а также по другим физико-химическим свойствам, таким, как извлекаемость органическими растворителями, устойчивость к действию света, ультразвука, феофитинизации.

По данным низкотемпературной и производной спектрофотометрии, в хлоропластах представлено восемь нативных форм хлорофилла *a*, каждая из которых характеризуется узкой полосой поглощения в красной области (661, 668, 675, 681, 686, 693, 700, 710 нм). Такая система форм универсальна для организмов различных филогенетических групп. По мнению Ф. Ф. Литвина, эти формы представляют собой термодинамически устойчивые типы агрегатов пигмента. Ему удалось проследить самосборку агрегатов с аналогичными спектральными свойствами в пленках, монослоях и растворах пигментов.

Миграция энергии между различными формами хло-

рофилла и бактериохлорофилла наблюдается как *in vivo*, так и *in vitro*. Зарегистрированы, например, следующие донор-акцепторные пары: хлорофилл *a* 668 → хлорофилл *a* 681; хлорофилл *a* 681 → хлорофилл *a* 693; бактериохлорофилл 800 → бактериохлорофилл 890; бактериохлорофилл 800 → бактериохлорофилл 850; бактериохлорофилл 850 → бактериохлорофилл 890 *). Эффективная миграция энергии между одними и теми же формами пигмента хлорофилла *a* наблюдается также в модельных системах, содержащих агрегаты пигментов нескольких типов.

Представление об эффективности миграции энергии дают следующие данные: квантовые выходы миграции энергии от каротиноидов к хлорофиллу *a*, от фикоэритрина к хлорофиллу *a*, от хлорофилла *b* к хлорофиллу *a*, от одной формы хлорофилла *a* к другой составляют соответственно 20—50, 80—90, 100, 100%.

Приемы экспериментального доказательства миграции энергии между фотосинтетическими пигментами *in vivo* и *in vitro* целесообразно объединить в четыре группы.

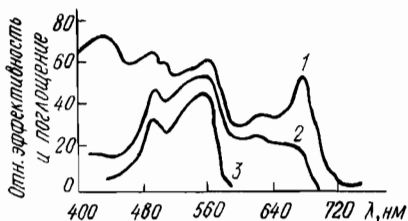
1. Тушение собственной флуоресценции донора энергии и сенсibilизация флуоресценции акцептора. Например, хлорофилл *b* флуоресцирует в растворе и в мутантах, в которых хлорофиллы *a* и *b* пространственно разобщены, но не флуоресцирует в нормальной клетке, где поглощенная энергия передается хлорофиллу *a* (сенсibilизация). Наиболее корректным проявлением сенсibilизированной флуоресценции являются спектры действия флуоресценции акцептора, в которых обнаруживаются не только его собственные полосы поглощения, но и полосы доноров энергии. Например, в спектрах действия флуоресценции хлорофилла *a* зеленых растений представлена полоса поглощения хлорофилла *b*, а в бурых, красных, сине-зеленых водорослях — полосы поглощения фикоэритрина (540—565 нм), фикоцианина (620—630 нм) и каротиноидов (480—500 нм). Сопоставление спектров поглощения донора и акцептора со спектрами возбуждения флуоресценции акцептора позволяет оценить квантовые выходы (эффективность) миграции энергии.

*) Положение длинноволнового максимума спектра поглощения в нанометрах (нм).

2. Проявление в спектрах действия самого фотосинтеза, оцениваемого по выделению кислорода, максимумов, принадлежащих аксессуарным пигментам (рис. 13).

3. Увеличение времени жизни флуоресценции хлорофилла в клетках водорослей при переходе от прямого возбуждения в собственной полосе поглощения (680 нм) к монохроматическому возбуждению в полосах поглощения фикоэритрина и фикоцианина (время миграции +

Рис. 13. Спектр поглощения (1) и спектр действия (2) красной водоросли *Porphyra nereocystis*, а также спектр поглощения экстрагированного фикоэритрина (3) (Нахо F., Blinks L., 1950)



время флуоресценции). На основании полученных временных характеристик флуоресценции хлорофилла *a* при последовательности возбуждения хлорофилл *a*, хлорофилл *b*, фикоцианин были рассчитаны времена миграции энергии. Они оказались равными $0,3 \cdot 10^{-9}$ с (фикоэритрин $\rightarrow$ фикоцианин), $0,5 \cdot 10^{-9}$ с (фикоцианин $\rightarrow$ хлорофилл *a*), $4 \cdot 10^{-10}$ с (хлорофилл *a* $\rightarrow$ хлорофилл *a*).

4. Уменьшение степени поляризации флуоресценции по мере зеленения этиолированных биологических объектов, свидетельствующее о миграции энергии между химически идентичными молекулами хлорофилла *a*.

Между следующими донор-акцепторными партнерами (фикоэритрин — фикоцианин — хлорофилл, хлорофилл *b* — хлорофилл *a*, одна форма хлорофилла *a* или бактериохлорофилла *a* — другая) миграция энергии осуществляется по индуктивно-резонансному механизму при соблюдении правил Ферстера, обязательных для переноса этого типа. В то же время перенос энергии каротиноид $\rightarrow$ хлорофилл *a* происходит, по-видимому, не по индуктивно-резонансному механизму, поскольку донор энергии практически не флуоресцирует, а по типу экситона или комплекса с переносом заряда. Миграция энергии с каротина на хлорофилл (50%-ная эффективность) воспроизводится в монослоях и пленках пигментов при достаточно тесном контакте молекул.

Теоретически вероятен и обменно-резонансный триплет-триплетный механизм миграции энергии между пигментами, поскольку пространственные требования (расстояние между молекулами порядка $10 \text{ \AA}$) для него в хлоропласте выполняются. Расчет показывает, что при концентрации хлорофилла в гране $0,1\text{—}1$ моль/л среднее расстояние между его молекулами составляет $10\text{—}20 \text{ \AA}$, а в ассоциатах пигмента *in vitro* еще меньше — $6\text{—}10 \text{ \AA}$. Однако в эксперименте (флеш-фотолиз) не удалось обнаружить заселенности триплетных уровней хлорофилла в растительных объектах не только при физиологических условиях, но и после почти полного (95%) окисления реакционных центров, являющихся «стоком» энергии возбуждения. Вполне понятно, что после перекрытия каналов к реакционным центрам, являющимся ловушками энергии, создаются благоприятные условия для спектрального выявления триплетных состояний пигмента.

В последние годы широко обсуждается вопрос об экситонном и полупроводниковом механизмах миграции энергии между молекулами хлорофилла *a* в пределах одной фотосинтетической единицы. Кроме теоретических предпосылок, стимулом к этому явилось обнаружение у изолированных пигментов фотопроводимости и полупроводниковой фототермолюминесценции, а также эффекта фотопроводимости у пленок сухих хлоропластов. Однако низкие значения квантового выхода фотопроводимости сухих хлоропластов ($10^{-5}\text{—}10^{-7}$) ставят под сомнение биологическую значимость переноса энергии по полупроводниковому механизму. Хотя эта величина возрастает до $10^{-1}\text{—}10^{-2}$ после учета малого времени жизни носителей заряда, отсутствие фотопроводимости во влажных пленках хлоропластов оставляет вопрос о полупроводниковой миграции энергии *in vivo* открытым.

Таким образом, миграция энергии обеспечивает эффективный сбор квантов света и транспорт поглощенной энергии к молекулам хлорофилла, которые непосредственно связаны с аппаратом, осуществляющим темновые стадии фотосинтеза. Иными словами, обнаруживается четкое разделение функций между молекулами хлорофилла, причем наряду со сборщиками энергии — простыми физическими сенситизаторами — формируется не-

большая доля (около 1%) «избранных» молекул (*реакционные центры*). Испытывая обратимые фотохимические окислительно-восстановительные превращения, эти молекулы запускают цепь транспорта электронов, представляющую собой стартовый акт химизма фотосинтеза.

Независимо от физической предыстории возникновения электронно-возбужденных состояний «избранных» молекул их стыковка с окислительно-восстановительными реакциями может идти либо через нижний синглетный, либо через нижний триплетный возбужденный уровень.

Согласно теоретическим квантовомеханическим расчетам, для хлорофилла характерна обычная схема расположения электронно-колебательных синглетных и триплетных уровней. Действительно, в многочисленных экспериментах были выявлены синглетные и триплетные состояния хлорофилла *in vitro*. Возникновение синглетного возбужденного состояния следует из способности хлорофилла поглощать видимый свет и флуоресцировать. Различными методами было выявлено и триплетное состояние хлорофилла: зарегистрированы фосфоресценция и характерные спектры ЭПР триплетных состояний хлорофилла *b* при низких температурах (77 К). Для хлорофиллов *a* и *b*, феофитина *a* и бактериохлорофилла триплетное состояние выявляется по спектрам триплет-триплетного поглощения, полученным с помощью флеш-фотолиза. Детальная характеристика синглетного и триплетного состояний и различных электронно-колебательных переходов в молекулах хлорофилла и родственных ему соединений дана в книге Г. П. Гуриновича, К. Н. Соловьева и А. Н. Севченко (см. литературу).

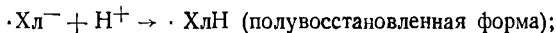
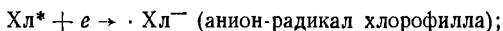
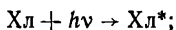
Какова роль синглетных и триплетных возбужденных состояний в фотохимии хлорофилла? Этот вопрос изучался на примере реакции фотовосстановления хлорофилла и родственных ему соединений в растворе. Можно привести ряд доказательств протекания этой реакции через триплетные состояния хлорофилла. Так, тетрапиррольные пигменты, у которых магний замещен на парамагнитный металл, эффективно тушащий фосфоресценцию, практически не фотовосстанавливаются. Реакция фотовосстановления ингибируется и добавками тушителей триплетно-возбужденных молекул — каротина или кислорода.

Соотносительный анализ роли триплетных и синглет-

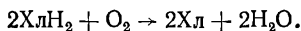
ных возбужденных состояний хлорофилла в осуществлении первичной фотохимической реакции первой и второй фотосистем был проведен Ф. Ф. Литвиным с сотр. На основании параметров длительного послесвечения и низкотемпературной термолюминесценции листьев растений, расчетов констант скоростей и величин энергий активации свечения при использовании ингибиторов второй фотохимической системы (диурон) и дезактиваторов триплетных и синглетных состояний (хинон, кислород) предполагается, что первая фотохимическая реакция осуществляется через синглетное, а вторая — через триплетное возбужденное состояние хлорофилла.

6. ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СТАДИИ ФОТОСИНТЕЗА

Крупнейшим достижением в области фотобиологии явилось открытие А. А. Красновским в 1948 г. реакции *обратимого фотовосстановления хлорофилла* в эвакуированном пиридиновом растворе в присутствии доноров водорода (аскорбиновая кислота) с образованием розовой формы пигмента с максимумом поглощения при 525 нм. В настоящее время считается общепризнанным, что первичная фотохимическая реакция фотосинтеза — это *обратимое окислительно-восстановительное превращение хлорофилла*. Квантовый выход реакции фотовосстановления хлорофилла составляет $2 \cdot 10^{-2}$ в этанол-водно-пиридиновых и $7 \cdot 10^{-2}$ в водно-пиридиновых растворах. Реакция Красновского протекает в несколько стадий:



В присутствии кислорода и других окислителей происходит обратная реакция, в результате которой восстанавливается исходная зеленая окраска раствора:

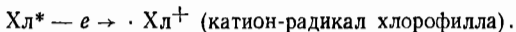
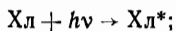


В анион-радикале электрон делокализован по орбитам системы сопряженных связей хромофорного ядра. Два атома водорода могут присоединяться к хлорофиллу, по-

видимому, различными способами в зависимости от условий среды, о чем свидетельствует выявление нескольких форм ХлН_2 , различающихся по спектрам поглощения и флуоресценции. Донорами электронов и протонов, кроме аскорбиновой кислоты, могут служить следующие соединения: фенилгидразин, цистеин, N-бензилникотинамид, НАДН₂, цитохром *c*; акцепторами, кроме кислорода, — различные азокрасители и хиноны, рибофлавин, НАД, НАДФ, виологены и другие вещества.

Реакция обратимого фотовосстановления характерна не только для хлорофилла *a*, но и для других хлорофиллов и родственных им соединений (хлорофиллы *b* и *c*, бактериохлорофиллы *a* и *b*, феофитины *a* и *b*, протохлорофиллы, различные порфирины). Она не наблюдается для фикоэритрина и фикоцианина.

В дальнейшем было установлено, что хлорофилл способен и к реакции обратимого фотоокисления в присутствии акцепторов электрона в спиртовых растворах. Такая реакция протекает, например, в присутствии *n*-хинона в вязких средах при температуре — 70°C. В противоположность деструктивному окислению хлорофилла на интенсивном свете в данном случае добавление восстановителей сопровождается частичной регенерацией исходного пигмента. Начальные стадии фотоокисления описываются следующей схемой:



Чрезвычайно важно, что способность хлорофилла в возбужденном состоянии воспринимать или отдавать электрон обеспечивает его перенос против термодинамического потенциала в тройной молекулярной системе акцептор — хлорофилл — донор, т. е. энергия кванта света с помощью хлорофилла как посредника расходуется и запасается при подъеме электрона с более «низкого» энергетического уровня у донора на более «высокий» у акцептора. Работа хлорофилла как «электронного насоса» доказывается на многочисленных модельных системах. Эффект сенсibilизированного «восходящего» транспорта электрона наблюдается независимо от того, начинается этот процесс с фотовосстановления хлорофилла

(возбужденный хлорофилл воспринимает электрон от донора на основной уровень, ранее занимаемый «возбужденным» фотоэлектроном, а затем «возбужденный» электрон передается акцептору) или с его фотоокисления («возбужденный» электрон хлорофилла отдается акцептору, затем электрон донора переходит на основной уровень хлорофилла). Указанные взаимоотношения могут быть проиллюстрированы схемой В. Б. Евстигнеева (рис. 14).

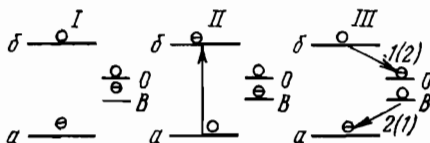


Рис. 14. Фотоперенос электрона в тройной системе хлорофилл — окислитель — восстановитель (Евстигнеев В. Б., 1966):

α , b — основной и возбужденный электронные уровни хлорофилла; O , B — электронные уровни окислителя и восстановителя (I — до освещения, II — после поглощения кванта света пигментом, III — после переходов электрона); индексы 1 (2) и 2 (1) указывают на временную последовательность переходов электрона, при которой хлорофилл окисляется и восстанавливается соответственно

Что будет первичным — восстановление или окисление хлорофилла, определяется природой среды и окислительно-восстановительными свойствами акцепторов и доноров электронов. Действительно, в зависимости от условий кислотно-основного равновесия (pH) в тройной системе преобладают то электронно-донорные, то электронно-акцепторные свойства хлорофилла.

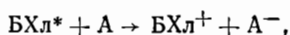
Именно благодаря способности к реакции обратимого окисления — восстановления хлорофилл может выполнять функции энергетического фотокатализатора при фотосинтезе, способствуя первичному запасанию энергии света в виде восстановленных интермедиатов.

Хотя бесспорных доказательств протекания реакции обратимого фотовосстановления — фотоокисления самого хлорофилла непосредственно в фотосинтезирующих организмах пока не получено, с этой реакцией могут быть связаны быстрые, обратимые изменения спектров поглощения пигментов, например, в полосе поглощения 890 нм

одной из форм бактериохлорофилла и в полосе поглощения 680 нм хлорофилла *a*, наблюдаемые при облучении их лазерными импульсами.

В пользу образования в клетке катион-радикалов хлорофилловых пигментов свидетельствуют и данные электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Фотосигнал ЭПР в *Rhodospirillum rubrum* приписан ион-радикалу бактериохлорофилла на основании, во-первых, соответствия между кинетикой ЭПР-сигнала и изменениями в поглощении при 870 нм как при комнатных, так и при низких (77 К, 4 К) температурах; во-вторых, близости значений редокс-потенциалов свободных радикалов и бактериохлорофилла *a*.

Из работ Парсона вытекает, что первичная реакция в бактериальном фотосинтезе:

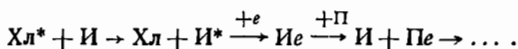


где А — первичный акцептор электрона невыясненной природы, представляет собой окисление бактериохлорофилла.

Ценная информация о кинетике окислительно-восстановительных превращений в реакционных центрах фотосинтезирующих объектов была получена с помощью лазерной техники. Было обнаружено, например, что скорость переноса электрона в системе донор → фотохимически активный хлорофилл → акцептор лежит в микросекундном интервале. Так, для пурпурных бактерий время переноса электрона от пигмента к акцептору равно 0,5, а для высших растений — 2 мкс. С такой скоростью перенос электрона от хлорофилла к акцептору осуществляется даже при температуре жидкого азота (–196° С), что указывает на его физическую природу. Реакция восстановления фотохимически активного хлорофилла (донор → пигмент) протекает с более низкой скоростью: 2 и 15 мкс для бактерий и высших растений соответственно. В реакции восстановления удалось вычленить два параллельных пути, один из которых зависит, а другой не зависит от температуры. Предполагается, что восстановление фотохимически активного хлорофилла происходит преимущественно в ходе второй реакции.

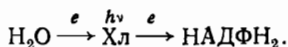
Итак, хлорофилловые пигменты в фотосинтезирующих

организмах управляют электронными потоками благодаря непосредственному окислению — восстановлению их, а не за счет физической сенсibilизации (миграция энергии) промежуточных редокс-интермедиатов (И) с передачей электрона переносчику (П) по схеме



Более того, в литературе высказывается предположение, что в одной из двух фотохимических систем первичным является *фотовосстановление*, в другой — *фотоокисление* хлорофилла. Например, установлено, что первичной фотохимической реакцией в первой фотосистеме (ФС I) у красных водорослей является окисление активной формы хлорофилла (P_{700}).

Таким образом, *стыковка между фотофизикой хлорофилла и запасанием поглощенной энергии света в органическом веществе обеспечивается его окислительно-восстановительными превращениями. В результате «холодный» электрон воды превращается в богатый энергией «горячий» электрон НАДФН₂, молекула которого и удерживает в себе солнечную энергию:*



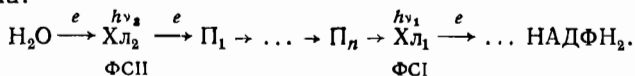
По современным представлениям, отрыв электрона от воды и перенос его к НАДФН₂ — не одноактный, а многоступенчатый процесс последовательных окислительно-восстановительных реакций в цепочке (электронный каскад) специализированных веществ — переносчиков электронов.

7. ДВЕ ФОТОСИСТЕМЫ. ТРАНСПОРТ ЭЛЕКТРОНОВ

Перенос одного электрона от воды к восстановленному идентифицированному переносчику электронов в цепи транспорта — ферредоксину связан с изменениями окислительно-восстановительного потенциала от 0,8 до —0,4 В, что соответствует затрате энергии в 1,2 эВ, или 28 ккал/моль. Поэтому одного кванта света (40 ккал) вполне достаточно для энергетического обеспечения элек-

тройного транспорта. В действительности картина гораздо сложнее.

Крупнейшее достижение в области фотосинтеза — открытие двух фотохимических реакций хлорофилла, включенных в относительно автономные пространственно разделенные фотосистемы. По данным Парка, в ламеллах гран локализованы обе фотосистемы, а в ламеллах стромы только первая. Совместная деятельность фотосистем обеспечивает не *одноактный*, а *двухактный* подъем электрона:



Каждая из фотосистем включает *фотохимически неактивные пигменты-светосборщики* (100—1000 молекул), *фотохимически активный хлорофилл* (1—2 молекулы) — *реакционный центр* — и *переносчики электронов*. Реакционные центры (или ловушки мигрирующей энергии первой и второй фотосистем) представляют собой две дискретные формы хлорофилла *a* (Хл₁ и Хл₂), обычно называемые в литературе *P*₇₀₀ и *P*₆₉₀ (по положению максимумов их поглощения).

При температурах 4 и 77 К хлорофилл 2 флуоресцирует при 698, а хлорофилл 1 — при 725 нм. Максимумы флуоресценции при 681 и 687 нм принадлежат формам хлорофилла *a* *P*₆₇₀ и *P*₆₇₈ — пигментам-светосборщикам фотосистемы II. Характерно, что пигменты фотосистемы II обладают большим квантовым выходом флуоресценции и меньшей степенью поляризации свечения, чем пигменты фотосистемы I. Данные поляризованной люминесценции для отдельного хлоропласта, а также дихроизм при 700 нм указывают на то, что небольшая доля молекул хлорофилла, дающего свечение при 720 нм (ФС I), находится в мембране в ориентированном состоянии.

Общепринятые ныне представления о двух формах хлорофилла, фотохимические превращения которых управляют транспортом электрона, сформировались под влиянием классических работ Эмерсона.

Эффект красного падения. При освещении растений монохроматическим светом в области длинноволнового спада спектра поглощения хлорофилла *a* в листе наблюдается уменьшение квантового выхода фотосинтеза —

красное падение (рис. 15). Фотосинтез практически прекращается при $\lambda=700$ нм, хотя полоса поглощения хлорофилла простирается вплоть до 750 нм (см. рис. 10). Характерно, что этот эффект усиливается по мере формирования фотосинтетического аппарата. Все это свидетельствует о том, что для эффективного фотосинтеза недостаточно возбуждения лишь одного типа молекул хлорофилла.

Эффект усиления. Если к длинноволновому свету добавить коротковолновый, квантовый выход фотосинтеза возрастает, достигая в пределе его обычных значений — $0,12 \text{ O}_2/h\nu$. При этом наблюдается выраженная неаддитивность: скорость выделения кислорода при совместном освещении двумя лучами ($v_{\text{общ}}$) превышает сумму скоростей выделения кислорода под действием каждого из них в отдельности: длинноволнового (v_1) и коротковолнового (v_2).

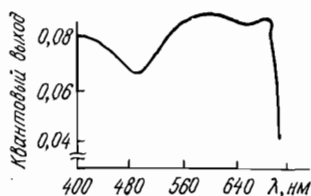


Рис. 15. Зависимость квантового выхода фотосинтеза хлореллы от длины волны света (Emerson R., Lewis C., 1943)

луче ($\lambda_1=700$ нм) зависит от длины волны коротковолновой подсветки (λ_2). Зависимость $E=f(\lambda_2)$ называется спектром действия эффекта Эмерсона. Он имеет хорошо выраженные пики при 670, 650 и 560 нм, соответствующие максимумам поглощения хлорофиллов *a* и *b* и фикобилинов.

Эффект усиления наводит на мысль о том, что каждый из лучей адресуется преимущественно только одной из двух пигментных систем, причем для полноценной деятельности фотосинтетического аппарата необходима их согласованная кооперация. Тот же вывод вытекает и из наблюдений Блинкса, Майерса, Френча.

Эффект Майерса и Френча заключается в сохранении усиления при прерывистом освещении с чередованием длинноволновых и коротковолновых импульсов даже тогда, когда темновой интервал между ними составляет несколько секунд. Очевидно, что этот интервал зна-

чительно превышает время жизни электронно-возбужденных состояний пигмента. Иными словами, эффект Эмерсона имеет не физическую, а химическую природу: «длинноволновые» и «коротковолновые» формы хлорофилла *a* образуют некоторые длительно живущие, но различные по природе продукты, являющиеся участниками единой последовательной цепи реакций.

Эффект Блинкса. Опыты Блинкса проводились по следующей схеме. Растение освещалось светом с $\lambda = 700$ нм до установления стационарной скорости фотосинтеза (v_{700}). После этого свет заменялся на более коротковолновый такой интенсивности, чтобы стационарная скорость фотосинтеза в обоих случаях была одинаковой, например, $v_{700} = v_{680}$. Казалось бы, это не должно отражаться на скорости фотосинтеза в момент смены одного монохроматического луча другим. Однако в эксперименте наблюдалось вполне достоверное временное его усиление с постепенным выходом на стационарный уровень: $v_{700} = v_{680} = v_{670}$ и т. д. Степень подобного усиления не одинакова для света различных длин волн второй подсветки. Зависимость $\Delta v = f(\lambda)$ получила название *спектра действия эффекта Блинкса*. Характерно, что спектры действия эффектов Эмерсона и Блинкса практически совпадают (рис. 16).

Итак, эффекты Эмерсона, Майерса—Френча и Блинкса определенно указывают на участие в процессе фотосинтеза не одной, а, по крайней мере, двух различающихся по спектрам поглощения пигментных систем, каждая из которых ответственна за образование определенных фотопродуктов, обладающих достаточно продолжительным временем жизни и необходимых для оптимального осуществления итоговой реакции фотосинтеза. В этой связи следует отметить еще два парадоксальных на первый взгляд явления. Во-первых, то, что свет, поглощаемый фикобилиновыми пигментами сине-зеленых и красных водорослей, обладает большей фотосинтетической активностью, чем свет, поглощаемый самим хлорофиллом *a*. Во-вторых, то, что при зеленении этиолированных проростков способность к фотосинтезу появляется только тогда, когда в них образуются длинноволновые формы пигмента, обнаруживающие максимум низкотемпературной люминесценции при 720 нм.

О различии промежуточных продуктов, образующихся в результате фотохимических реакций фотосистем I (длинноволновая) и II (коротковолновая), свидетельствуют и дифференциальные спектры поглощения (свет — темнота) фотосинтезирующих клеток, подвергаемых интенсивному длинноволновому и коротковолновому освещению. Анализ полученных спектров, как и темновых дифференциальных спектров окислительно-восстановительного титрования, возникающих при изменениях E_h

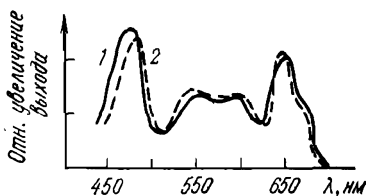
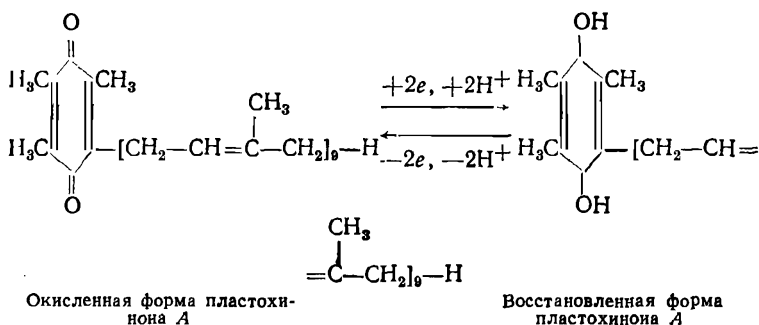


Рис. 16. Спектры действия эффекта Эмерсона (1) и эффекта Блинкса (2) (Mohr H., 1969)

путем добавления окислителей и восстановителей, позволил выяснить химическую природу различных переносчиков электронов на участках пути между водой и хлорофиллом 2, хлорофиллом 2 и хлорофиллом 1, хлорофиллом 1 и НАДФН₂. Были идентифицированы основные переносчики электронов в фотосинтетической цепи, способные существовать как в окисленной, так и в восстановленной форме.

Пластохиноны — переносчики, близкие к убихинону дыхательной цепи митохондрий. Пластохиноны обнаружены только у высших растений и водорослей, выделяющих в ходе фотосинтеза кислород. Их концентрация в хлоропластах довольно высока. Так, например, на 100 молекул хлорофилла приходится около 20 молекул пластохинонов. Известно четыре типа пластохинонов *A*, *B*, *C* и *D*. К пластохинонам иногда относят также токоферолы, токохиноны и витамин К₁. Как показали специальные опыты, критическое значение для транспорта электронов имеет пластохинон *C*. По структуре пластохиноны представляют собой метилированные производные *n*-бензохинонов, соединенные с изопреновыми цепочками различной длины. Окислительно-восстановительные превращения происходят в бензольном кольце хинонной головки $R=O + e + H^+ \rightleftharpoons R-OH$:



Максимум поглощения окисленной формы 263 нм, восстановленной — 290 нм. Пластохинон А имеет редокс-потенциал +0,115, а пластохинон С — 0,05 В.

Цитохромы — гемсодержащие белки, простетическая группа которых близка к гему пероксидазы и каталазы. Одноэлектронные окислительно-восстановительные превращения испытывает железо гема $\text{Fe}^{3+} + e \rightarrow \text{Fe}^{2+}$. У фотосинтетиков выявлены цитохромы трех типов: *c*, *b* и *f*, причем тип *c* наиболее широко распространен у микроорганизмов. Количественное соотношение цитохромов *b*₆, *b*₅₅₉ и *f* в хлоропластах высших растений составляет 2:2:1. На одну молекулу цитохрома *f* приходится около 400 молекул хлорофилла, а на две молекулы цитохрома *b* (*b*₆ + *b*₅₅₉) около 118 молекул пигмента.

Цитохром *f* высших растений имеет молекулярный вес белкового носителя 110 000 и содержит две простетические группы. Три полосы поглощения цитохрома *f* (α , β и γ) располагаются при 554, 524 и 424 нм. Его редокс-потенциал равен +0,36 В.

Цитохром *b*₅₅₉. Обнаружены две формы цитохрома *b*₅₅₉: низкопотенциальная с величиной окислительно-восстановительного потенциала +0,08 В и высокопотенциальная — с потенциалом +0,35 В.

Цитохром *b*₆. Длинноволновый максимум поглощения восстановленной формы 563 нм, окислительно-восстановительный потенциал — 0,04 В.

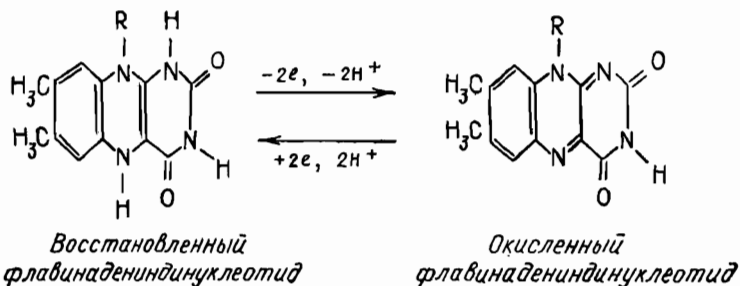
Цитохром *c*. Известно несколько видов цитохрома *c*: *c*₂ (*c*₅₅₀), *cc*¹ (*c*₄₃₀), *c*₅₅₂, *c*₅₅₅. Редокс-потенциал *cc*¹ равен +0,18, *c*₅₅₅ — +0,32 В.

Пластоцианин. Белок, содержащий два атома меди

($M=21\,000$) с максимумом поглощения при 521 нм и $E_h = +0,37$ В. На одну молекулу пластоцианина в хлоропласте приходится примерно 300 молекул хлорофилла. Окисленная форма пластоцианина синего, восстановленная зеленого цвета. Окислительно-восстановительные превращения обусловлены реакцией $\text{Cu}^{2+} + e \rightleftharpoons \text{Cu}^+$.

Ферредоксин. Белок, содержащий негеминное железо. Молекулярный вес ферредоксина 12 000. Окисленная форма ферредоксина имеет максимум поглощения при 464 нм, $E_h = -0,42-0,49$ В. У бактерий обнаружены другие негеминные железопротеиды: с E_h , равным $+0,3-0,35$ и $-0,61$ В (рубредоксин).

Ферредоксин-НАДФ-редуктаза — флавопротеид с молекулярным весом около 50 000. Максимумы поглощения 456, 385 и 275 нм. Окислительно-восстановительные превращения ($\pm 2\text{H}$) происходят в изоаллоксазиновом кольце протетической группировки — флавинадениндинуклеотида:



(E_h переносчика около $-0,4$ В.)

Кроме перечисленных идентифицированных участников транспорта электронов в хлоропластах обнаружены еще четыре чрезвычайно важных переносчика электронов, природа которых окончательно не выяснена. Их принято обозначать символами Z , Q , C_{550} и X . Есть все основания предполагать, что именно эти переносчики, выступая в роли доноров или акцепторов электронов, непосредственно взаимодействуют с фотохимически активными формами пигментов — хлорофиллом 1 и хлорофиллом 2.

Переносчик Z . Предполагается, что он является марганецсодержащим белком и выступает в роли посредника

при передаче электрона от воды к хлорофиллу 2. Величина окислительно-восстановительного потенциала не установлена.

Переносчики Q и C_{550} . Обнаружены по тушению флуоресценции хлорофилла (Q) и индуцированному светом обратимому уменьшению поглощения при 550 нм (C_{550}). Считается, что изменение этих свойств является отражением активности одного и того же вещества. В мутантах, дефицитных по Q, не удается обнаружить C_{550} . Кривые окислительно-восстановительного титрования этих переносчиков близки. С другой стороны, высказывается предположение, что Q — железосодержащий белок, а C_{550} — комплекс белка с каротиноидом.

Переносчик X (P_{430}). Ему приписывается главный максимум в дифференциальных спектрах при 430 нм. Окислительно-восстановительный потенциал приблизительно равен $-0,6$ В. Предполагается, что по химической природе он может быть отнесен к флавинам или птеридинам.

Таким образом, транспорт электронов от воды к НАДФ осуществляется с помощью последовательных окислительно-восстановительных превращений большого числа переносчиков. Не только значения редокс-потенциалов, но и ряд других соображений, которые будут изложены ниже, позволяют конкретизировать приведенную раньше схему: $H_2O \xrightarrow{e} Z \xrightarrow{e} Xl_2^* \xrightarrow{e} Q (C_{550}) \xrightarrow{e} \text{пластохинон} \xrightarrow{e} \text{пластоцианин (цитохром } f) \xrightarrow{e} Xl_1^* \xrightarrow{e} X \xrightarrow{e} \text{ферредоксин} \xrightarrow{e} \text{ферредоксин-НАДФ-редуктаза} \xrightarrow{e} \text{НАДФН}_2$. Крайне существенно, что длинноволновая и коротковолновая системы индуцируют антагонистические окислительно-восстановительные превращения ряда переносчиков электронов. Так, длинноволновое освещение сопровождается окислением цитохрома *f* или пластоцианина с восстановлением НАДФ. Коротковолновая подсветка приводит к обратной реакции.

В работах Витта, Кушковского и Фока показано, что свет, поглощаемый преимущественно фотосистемой II (хлорофилл 2), приводит к восстановлению, а длинноволновый свет $\lambda=700$ нм (фотосистема I) — к окислению пластохинона и пластоцианина. Описаны аналогичные

восстановительные превращения экзогенных редокс-соединений (например, хинонов). В пользу обратимых окислительно-восстановительных превращений переносчиков электронов свидетельствуют также опыты Батлера. При освещении хлоропластов красным светом, адресованным преимущественно хлорофиллу 2, наблюдается возгорание его флуоресценции во времени. Противоположным образом действует дальний красный свет, преимущественно адресованный хлорофиллу 1. При этом наблюдается развивающееся во времени тушение флуоресценции хлорофилла 2. Эти эффекты могут быть объяснены тем, что окисленная форма переносчика Q является эффективным тушителем флуоресценции хлорофилла 2 в хлоропласте в соответствии со схемой



Своеобразие этого тушения состоит в том, что энергия возбуждения хлорофилла растрачивается не на тепло, а на фотохимическую реакцию («движение» электронов). Восстановление означает «запирание» стока энергии на фотохимию: все уже восстановлено, и хлорофилл беспрепятственно флуоресцирует, поскольку отсутствует конкуренция.

Окисленный Q может собирать энергию от всех молекул хлорофилла в фотосинтетической единице по схеме пигменты-светосборщики $\xrightarrow{\text{миграция энергии}}$ фотохимически активный хлорофилл (реакционный центр) $\rightarrow$ фотовосстановление Q .

Таким образом, приведенные данные по спектральному «зондированию» фотосинтеза уже подтверждают мысль о двух фотохимических системах, содержащих различные формы хлорофилла. Фотохимические окислительно-восстановительные превращения активных форм хлорофилла индуцируют последовательное движение электронов в общей цепи переносчиков. *Электрон, отрываемый при фотолизе воды фотосистемой II и передаваемый ее конечному восстановленному переносчику пластоцианину или цитохрому f, служит донором для терминального участка электронного каскада, управляемого фотосистемой I.*

Более вескими доказательствами существования двух фотосистем являются опыты по разделению систем с помощью ингибиторов фотосинтеза (химическое разделение) и дифференциального центрифугирования раздробленных хлоропластов (механическое разделение).

При *химическом разделении* используются вещества, блокирующие электронный транспорт на его различных участках (моноурон, диурон, фтиокол, дихлорфенилдиметилмочевина, фенантролин и др.). Ингибирование электронного транспорта сопровождается исчезновением индуцированных светом обратимых окислительно-восстановительных превращений переносчиков. Одновременно прекращается фотосинтез. Хлоропласты перестают синтезировать НАДФН₂ и выделять кислород. Это прямо указывает на электронную природу процессов, вызываемых фотохимическими превращениями пигментов. Однако блокирование фотосинтеза может быть снято добавлением экзогенных доноров или акцепторов электронов. Если после разобщения двух фотосистем диуроном ввести акцептор электронов для фотосистемы II, последняя при коротковолновом освещении будет нормально функционировать. Естественно, что при этом акцептор (краситель), воспринимая электрон воды, восстанавливается. И наоборот, в присутствии доноров электрона (аскорбиновая кислота) работает фотосистема I, о чем свидетельствует образование НАДФН₂. В этом случае донор электронов окисляется, отдавая свой электрон НАДФ.

К утрате свойственных хлоропласту функций приводит также избирательное удаление отдельных компонентов электронно-транспортной цепи. Для этого используют сравнительно мягкие воздействия на хлоропласт: малополярные растворители, детергенты, ультразвук, ферменты. Например, вымывание из лиофилизированных хлоропластов пластоцианина при воздействии на них гептаном приводит к утрате функций фотосистемы I. Эти функции восстанавливаются после добавления препарата пластоцианина.

Остановимся теперь более подробно на *механическом разделении* двух фотосистем. В 1964 г. Бордману после разрушения хлоропластов детергентом дигитонином с помощью дифференциального центрифугирования удалось выделить легкие и тяжелые фрагменты ламелл при

144 000 и 10 000 g соответственно. Оказалось, что легкие и тяжелые фрагменты резко различаются по химическому составу. Для легких фракций характерны соотношение $(Хл\ a)/(Хл\ b)$, равное 5,3, высокое содержание P_{700} , цитохрома и железа. В тяжелых фракциях соотношение $(Хл\ a)/(Хл\ b)$ равняется 2,3, они содержат мало P_{700} , но много марганца и цитохрома b_6 . Иными словами, химический состав свидетельствует о преимущественной обогащенности легких фрагментов компонентами фотосистемы I, а тяжелых — фотосистемы II (табл. 5).

Таблица 5. Характеристики легких (144 000g) и тяжелых (10 000 g) фрагментов хлоропластов

Характеристика	Целый хлоропласт	Фрагменты хлоропластов	
		144 000 g	10 000 g
$[P_{700}]/[\text{хлорофилл}]$	1/450	1/200	1/700
$[\text{Цитохром } b]/[\text{цитохром } f]$	3,6	2,3	6,1
$[Mn]/[\text{хлорофилл}]$	1/73	1/244	1/52
$[\text{Пластохинон общий}]/[\text{хлорофилл}]$	1/14	1/13	1/33

Тяжелая фракция обладает также способностью восстанавливать красители на свету с выделением O_2 , но плохо восстанавливает НАДФ за счет электрона воды. Легкая же фракция в присутствии восстановленного дихлорфенолиндифенола энергично восстанавливала НАДФ, но не восстанавливала окисленную форму этого красителя. Следовательно, и по функциональным признакам легкая фракция включала в себя молекулярный аппарат фотосистемы I, а тяжелая — молекулярный аппарат фотосистемы II.

Этот вывод подкрепляется люминесцентными измерениями. Тяжелые фракции в опытах Бордмана обладали в пять раз более интенсивной, но менее поляризованной ($P=2,7\%$) флуоресценцией, чем легкие ($P=5,4\%$). При температуре жидкого азота в спектрах люминесценции легких фракций преобладал компонент 720 нм, который составлял 97% от общей интенсивности свечения.

В отличие от этого низкотемпературная люминесценция тяжелой фракции в значительной мере была представлена полосой 695 нм. Для тяжелых фрагментов наблюдалось также 3—4-секундное возгорание флуоресценции при освещении красным светом, что, как отмечалось ранее, связано с восстановлением переносчика Q в фотосистеме II. Естественно, что легкие фрагменты хлоропластов таким свойством не обладали, поскольку фотосистема I не содержит Q , способного в окисленной форме тушить свечение.

Вполне понятно, что легкие и тяжелые фрагменты не представляют собой чистые фотосистемы I и II, а лишь в той или иной мере обогащены ими, чем и объясняется смешанный характер спектров флуоресценции (рис. 17). Вслед за Бордманом фрагменты хлоропластов, обогащенные фотосистемами I и II, были получены рядом авторов (Вернон, Митчел, Шлык и др.). Они использовали для дезинтеграции хлоропластов не только дигитонин, но и другие детергенты (третон X-100, додецилсульфат натрия), ультразвук, а также простое механическое раздробление хлоропластов. Затем фрагменты разделялись методами гельэлектрофореза или ультрацентрифугирования в градиенте плотности.

При определенных условиях удается осуществить реконструкцию мембранных структур из легких и тяжелых фрагментов с частичным восстановлением функций, свойственных фотосинтетическому аппарату.

Наконец, необходимо упомянуть о «генетическом» разделении двух фотосистем — использовании мутантов, дефицитных по переносчикам электронов. Был, например, получен мутантный штамм водоросли *Chlamidomonas reinhardtii*, хлоропласты которого не содержали пластоцианина. Как и ожидалось, фрагменты хлоропластов это-

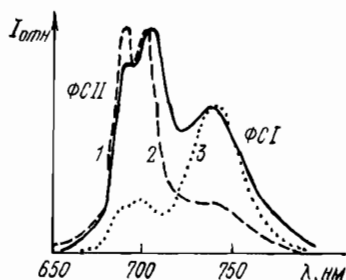


Рис. 17. Спектры флуоресценции хлоропластов (1) и их легких (2) и тяжелых (3) фрагментов ($T=77\text{ K}$) (Kok B., Rainski H., 1966)

го мутанта не обладали способностью к восстановлению НАДФ, но приобретали ее после добавления экзогенного пластоцианина.

Итак, «восходящий» транспорт электронов «питается» энергией света, поглощаемого двумя фотосистемами. Перенос каждого электрона от воды к НАДФ через цепь переносчиков требует поглощения не одного, а, по крайней мере, двух квантов света двумя различными формами хлорофилла а — P_{690} и P_{700} .

К настоящему времени мы располагаем сведениями о природе партнеров в цепи транспорта электрона, об их относительной концентрации [переносчик]/[хлорофилл]. Последовательность расположения переносчиков электронов и места их стыковки с пигментами первой и второй фотохимических систем были установлены на основании величин стандартных редокс-потенциалов различных переносчиков (нисходящий транспорт электрона возможен только в направлении увеличения E_h) и временных параметров ($\tau_{1/2}$) их окислительно-восстановительных превращений, показывающих, какой переносчик раньше, а какой позже испытывает подобные превращения после возбуждения P_{690} и P_{700} (рис. 18). Кроме того, информация о строении цепи транспорта электрона была получена при изучении фотоиндуцированных превращений переносчиков при химическом, механическом и генетическом разделении двух фотосистем фотосинтеза.

Проанализировав обширный фактический материал, Хилл и Бендалл предложили схему электронной стадии фотосинтетического процесса, которая после ряда уточнений и модификаций получила название *Z-схемы* (рис. 19). Как в фотосистеме II, так и в фотосистеме I передача электронов по цепи переносчиков осуществляется по *одноэлектронному* механизму.

При поглощении одного кванта света фотосистема II за время менее 10^{-5} с поднимает один электрон от воды через первичный переносчик электрона к первичному акцептору электронов. Измерены квантовые выходы реакций его восстановления фотосистемой II и окисления фотосистемой I, которые оказались равными 1, т. е. $e/h\nu = 1$. Подъем электрона сопровождается изменениями редокс-потенциала от +0,8 до 0,0 В, т. е. восстановленный Q временно запасает в себе энергию 18 ккал/моль,

являющуюся частью световой энергии, заключенной в электронно-возбужденном состоянии хлорофилла *a*. Следовательно, *основная функция фотосистемы II — фотолиз воды с образованием кислорода и богатых энергией электронов*: $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 1/2 \text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+$.

В механизме фотолиза воды до сих пор остается много неясного. Очевидно, что отрыв электрона от воды может произойти только в том случае, если сродство к

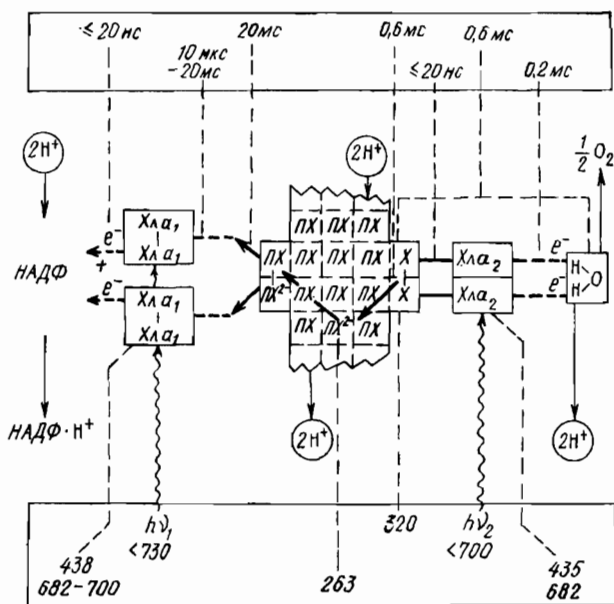


Рис. 18. Две фотосистемы и цепь переноса электронов при фотосинтезе (Witt H., 1971)

В верхней части схемы — времена жизни промежуточных продуктов, в нижней — максимумы в дифференциальных спектрах поглощения, нм

электрону у возбужденного хлорофилла будет выше, чем у воды. Возможно, что роль переносчика *Z* сводится к облегчению донор-акцепторных взаимодействий между неполярной молекулой хлорофилла и полярной молекулой воды.

При добавлении экзогенных красителей, являющихся

нии доноров электронов фрагментами фотосистемы I в присутствии метилового красного как акцептора электронов для света с $\lambda > 700$ нм.

Пигментный фонд фотосистемы I включает прежде всего фотохимически активную форму хлорофилла — P_{700} . Предполагается, что P_{700} является агрегированной формой хлорофилла a , находящейся, возможно, в комплексе с цитохромом f . Кроме того, в пигментный фонд фотосистемы I входят пигменты-светосборщики, к которым относятся хлорофилл a_{693} , хлорофилл a_{668} и каротиноиды. В фотосистему I входят также белки — переносчики электронов ферредоксин и ферредоксин-НАДФ-редуктаза, через окислительно-восстановительные превра-

Фотосистема I

Дополнительный комплекс	Комплекс реакционного центра
60—80 Хл a	20—25 Хл a
15 β -каротин	1 P_{700}
1 цитохром f	Акцептор
2 цитохром b_6	
15 пластохинон	
Липиды	

Фотосистема II

Дополнительный комплекс	Комплекс реакционного центра
20 ксантофилл- $\left\{ \begin{array}{l} 81 \text{ Хл } a \\ 48 \text{ Хл } b \end{array} \right\}$ - белок	15 Хл a -белок
	1 цитохром b_{559}
	Акцептор
165 липид	

Рис. 20. Молекулярный состав фотосистем I и II (Vernon L. et al., 1971)

щения которых электрон с некоторой потерей энергии спускается к НАДФ и восстанавливает его.

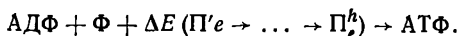
Ориентировочное представление о молекулярном составе фотосистем I и II дает схема Вернона, в основу которой легли данные, полученные при химическом анализе легких и тяжелых фрагментов ламелл хлоропластов (рис. 20).

Таким образом, согласованная деятельность двух фотосистем обеспечивает превращение «бедного» энергией электрона, возникающего при окислении воды, в «богатый» энергией электрон НАДФН₂, который является источником активированного водорода — восстановительной силы, используемой в дальнейшем для синтеза углеводов из углекислого газа.

Транспорт электронов представляет собой одноэлектронный процесс и требует для своего завершения поглощения, по крайней мере, двух квантов света, по одному в каждой из фотосистем. В ходе транспорта электронов часть энергии квантов света запасается также в макроэргических соединениях — АТФ (фотосинтетическое фосфорилирование).

8. ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

Фотосинтетическое фосфорилирование открыто Арноном в 1954 г. Этот процесс представляет собой синтез АТФ из АДФ и минерального фосфата, происходящий за счет энергии квантов света. По существу, фотосинтетическое фосфорилирование в хлоропластах близко к окислительному фосфорилированию в митохондриях: в обоих случаях имеет место сопряжение между экзергонической реакцией окисления переносчиков электронов и эндергонической реакцией синтеза АТФ:

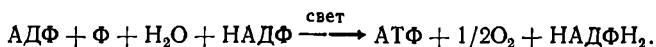


При оптимальных условиях прохождение одного электрона по всей Z-схеме приводит к синтезу одной молекулы АТФ, т. е. квантовый выход образования АТФ (АТФ/ $h\nu$) равняется 0,5. В опытах с использованием импульсного освещения и варьирования межимпульсных

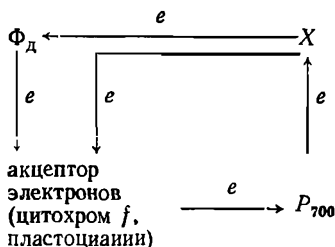
интервалов удалось показать, что образование макроэрга осуществляется за время, меньшее 0,01 с.

Различают нециклическое, циклическое и псевдоциклическое фосфорилирование. *Нециклическое фосфорилирование* сопряжено с линейной нисходящей ветвью транспорта электронов между двумя фотосистемами. В соответствии с этим в спектре действия нециклического фосфорилирования имеется максимум при 660—664 нм с резким падением эффективности в длинноволновой области (700—720 нм). Предполагается также, что нециклическое фосфорилирование может происходить на участках Z-схемы между H_2O и Z, а также между X и НАДФ. Однако разницы в энергии между восстановленным X и НАДФН₂ недостаточно для синтеза АТФ. Поэтому теоретически требуется прохождение по этой цепи, по крайней мере, двух электронов. Кроме того, это предположение плохо согласуется со спектрами действия нециклического фосфорилирования.

В целом суммарная реакция нециклического фосфорилирования независимо от места его локализации может быть записана в виде



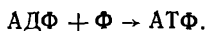
Циклическое фосфорилирование заключается в синтезе АТФ при циклическом движении электрона в пределах фотосистемы I:



При циклическом фосфорилировании поток электронов, свойственный Z-схеме, прерывается и электрон, не доходя до НАДФ, «скатывается» вниз через цитохром f, пластоцианин или пластохинон к хлорофиллу P_{700} . Повторное поглощение кванта света P_{700} приводит к очередному циклическому движению электрона. В цепь цик-

лического транспорта входит также специальный переносчик электронов — цитохром b_6 . Об участии этих переносчиков электронов в циклическом фосфорилировании свидетельствуют опыты с использованием специфических ингибиторов и мутантов, дефицитных по отдельным компонентам электронно-транспортной цепи.

Единственным продуктом циклического фосфорилирования является АТФ:



При изучении циклического фосфорилирования используют, как правило, различные добавки — доноры и акцепторы электронов (феназинметасульфат, витамин K_3 , 2,6-дихлорфенолиндофенол), которые могут включаться в цикл и облегчать движение электрона. Циклическое фосфорилирование не нарушается моноуроном и диуроном — ингибиторами электронного транспорта фотосистемы I. Спектр его действия имеет максимум при 710 нм. Это еще раз указывает на непосредственную связь циклического фосфорилирования с фотосистемой I.

Следует отметить, что перепад энергии между ферредоксином и цитохромом f достаточен для образования даже двух молекул АТФ. Поэтому в нисходящей цепи транспорта электронов может быть не одно, а два места сопряжения между окислением и фосфорилированием. На основании анализа кинетических кривых окислительно-восстановительных превращений отдельных переносчиков в цикле к этому же выводу пришел А. Б. Рубин.

С электронными потоками в пределах фотосистемы I связан еще один тип фотофосфорилирования — *псевдоциклический*. Псевдоциклическое фотофосфорилирование можно рассматривать как химический зашунтированный нециклический процесс. Он активируется такими катализаторами, как феназинметасульфат, флавиномононуклеотид, витамин K_3 . В противоположность циклическому псевдоциклическое фосфорилирование подавляется диуроном и требует присутствия кислорода, который вовлекается, по-видимому, в цепь окислительно-восстановительных превращений.

Наиболее высокая скорость синтеза АТФ зарегистрирована в случае циклического фосфорилирования: в присутствии феназинметасульфата хлоропласты в час погло-

щают 1000—2000 мкмоль неорганического фосфата на 1 мг хлорофилла. Значительно медленнее синтезируется АТФ при нециклическом (50—200) и псевдоциклическом фосфорилировании (менее 50 мкмоль фосфата в час на 1 мг хлорофилла).

Рассмотрим теперь имеющиеся данные о количестве и конкретной локализации сопрягающих центров в нециклическом фосфорилировании. В работах японского исследователя Изава показано, что в цепи транспорта электрона между Q и P_{700} функционируют два сопрягающих центра. Один из них (центр II) локализован в цепи между пластохиноном и цитохромом f , а другой (центр I) — находится между Q и участком цепи, атакуемым диуроном.

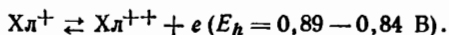
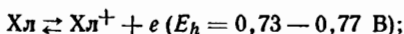
С помощью соответствующих ингибиторов транспорта, доноров и акцепторов электронов удалось оценить эффективность фосфорилирования в каждом из центров. Так, при оптимальных условиях величина $P/2e$ для центра I оказалась равной 0,6—0,7, а для центра II — 0,3—0,4.

Центры обнаруживают различную чувствительность к ингибиторам и характеризуются различными рН оптимумами.

9. РАСЩЕПЛЕНИЕ ВОДЫ И ВЫДЕЛЕНИЕ КИСЛОРОДА

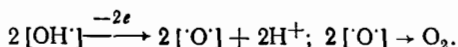
В 1941 г., используя метод меченых атомов (H_2O^{18}), советские ученые А. П. Виноградов и Р. В. Тейс показали, что источником кислорода, выделяющегося при фотосинтезе, является не углекислый газ, а вода. Тем не менее внутренний механизм разложения воды до сих пор окончательно не выяснен. Очевидно только то, что с водой должен реагировать сильный окислитель с $E_h \geq +0,81$ В. Как уже отмечалось, наиболее распространена точка зрения, что расщепление воды осуществляется в пределах фотосистемы II. При этом с водой взаимодействует не сам хлорофилл, а некий окислитель (Z) неизвестной природы. По мнению Киаффа и Арнона, в окисление воды в пределах фотосистемы II вовлекается высокопотенциальный цитохром b_{559} . Однако экспериментального подтверждения это предположение еще не получило.

С другой стороны, в работах В. М. Кутюрина развивались представления о том, что сам хлорофилл может реагировать с водой. Действительно, окислительно-восстановительные потенциалы полуокисленной и окисленной форм хлорофилла имеют высокие положительные значения:

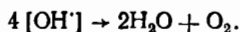


Следовательно, E_h окисленной формы хлорофилла делает термодинамически возможным прямое окисление воды хлорофиллом (E_h системы $\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 1/2 \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2e$ равен $+0,81 \text{ В}$).

По-видимому, вода соединяется водородной связью с кислородом циклопентанового кольца невозбужденной молекулы хлорофилла. После возбуждения молекулы хлорофилла электрон от воды переносится к азоту третьего пиррольного кольца и происходит перестройка в системе сопряженных двойных связей хлорофилла. В результате вода распадается на протон и гидроксильный радикал. В дальнейшем, по-видимому, происходит окисление хлорофиллом гидроксильных радикалов с высвобождением молекулярного кислорода:



В качестве альтернативного пути рассматривается диспропорционирование гидроксильных радикалов, образующихся при окислении четырех молекул воды:



Однако для быстрого диспропорционирования короткоживущих гидроксильных радикалов (по обеим схемам) необходим специальный механизм их коллектирования.

Вместе с тем не вызывает сомнения большая роль при разложении воды Мп-содержащих белков. Было показано, что фрагменты хлоропластов, не содержащие марганца, не обладают способностью к выделению кислорода на свету, в то время как Мп-содержащие фрагменты такую способность обнаруживают. Предполагается, что Мп образует соединения хелатного типа с белками,

из которых сформированы водоокисляющие комплексы фотосинтетического аппарата. Согласно Ренжеру, в хлоропластах представлено два типа доноров электронов фотосистемы II, один из которых (первичный донор) непосредственно реагирует с фотохимически активным хлорофиллом, а второй (вторичный донор) представляет собой белковый комплекс, с которым прочно связаны 4—6 атомов четырехвалентного Mn^{4+} . Фотоокисление воды, по Ренжеру, осуществляется в ходе нескольких последовательных реакций, включающих окисление первичного и вторичного доноров, воды и образование молекулярного кислорода.

Характерно, что водоокисляющие комплексы хлоропластов очень чувствительны к экстремальным факторам внешней среды. К потере способности окислять воду приводят: нагревание хлоропластов до высоких температур, их обработка ингибиторами ферментов, мочевиной, детергентами, облучение УФ-светом. Все это указывает на белковую природу систем, ответственных за расщепление воды при фотосинтезе.

10. ГИПОТЕЗА О ТРЕХ ФОТОРЕАКЦИЯХ И ДВУХ ФОТОСИСТЕМАХ В ФОТОСИНТЕЗЕ

Гипотеза Арнона значительно усложнила традиционные представления о механизме фотосинтеза. Арнон предполагает, что движение электрона от воды к НАДФ осуществляется двумя фотохимическими реакциями в пределах фотосистемы II (рис. 21). Каждая из этих реакций связана с одной и той же коротковолновой формой фотохимически активного хлорофилла. Фотохимически активные молекулы хлорофилла соединены цепью переносчиков электронов, которые включают первичный акцептор электронов S_{550} , пластохинон, цитохром b_{559} , пластоцианин. Пластоцианин — донор электрона для второй молекулы хлорофилла. При поглощении кванта света происходит перенос электрона к ферредоксину — самому восстановленному соединению в цепи транспорта электронов. В конечном счете происходит восстановление НАДФ. Весь транспорт электрона от воды к НАДФ требует поглощения двух квантов красного света

(а не красного и дальнего красного, как это постулирует Z-схема) и приводит к образованию НАДФН₂, АТФ (нециклическое фосфорилирование) и выделению кислорода.

Третья фотохимическая реакция, свойственная, по Арнону, лишь фотосистеме I (хлорофилл I + дальний красный свет), не связана с образованием НАДФН₂ и необходима только для образования двух молекул АТФ

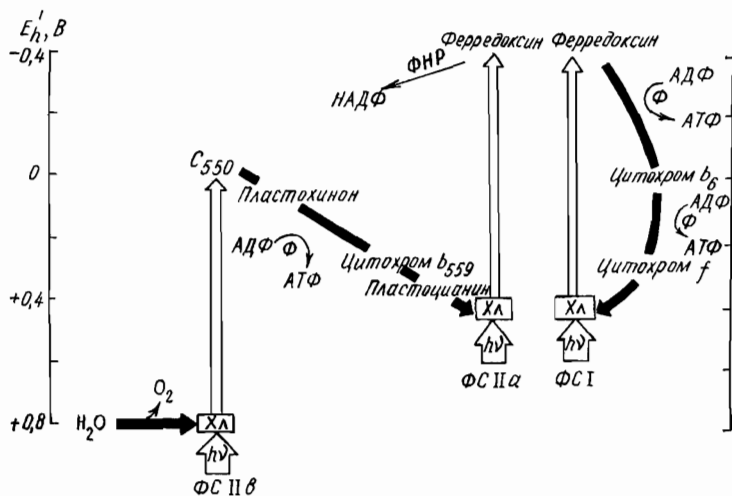


Рис. 21. Схема трех фотохимических реакций в фотосинтезе (Knaiff D., Арнон D., 1969)

в ходе циклического фосфорилирования. Цикл включает фотохимически активную длинноволновую форму хлорофилла, ферредоксин, цитохром b_6 и цитохром f . Донор электрона для хлорофилла — цитохром f , акцептор — ферредоксин. Фотосистема I является автономной и изолированной от фотосистемы II. Гипотеза Арнона базируется в основном на двух полученных им экспериментальных фактах: 1) отсутствии красного падения (эффекта Эмерсона) при образовании НАДФН₂ и 2) росте квантового расхода образования НАДФН₂ в области поглощения первой фотосистемы ($\lambda > 690$ нм).

Хотя схема Арнона соответствует всем квантовым расходам образования продуктов фотосинтеза, она недо-

статочно аргументирована. Исходя из гипотезы Арнона, нельзя объяснить красное падение эффективности фотосинтеза, регистрируемое по выделению кислорода, и антагонизм красного и дальнего красного света в обратимых окислительно-восстановительных превращениях переносчиков электронов.

11. ОСОБЕННОСТИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ФОТОСИНТЕЗА

Несмотря на то, что механизмы бактериального и растительного фотосинтеза имеют много общего, между ними есть некоторые частные различия. Фотофизические и первичные фотохимические стадии любого фотосинтеза универсальны с тем лишь исключением, что у бактерий функцией фотохимически активного пигмента обладает не хлорофилл, а бактериохлорофилл. Наиболее выраженные различия обнаруживаются на стадии электронного транспорта и сопряженного с ним фосфорилирования. Они касаются числа фотосистем, управляющих электронным транспортом, природы и последовательности расположения в цепи переносчиков электронов. Кроме того, между различными представителями бактериального мира отмечается некоторая вариабельность по всем этим признакам.

Хотя две фотохимические реакции, управляющие транспортом электронов, а следовательно, и фотосинтезом, выявлены как у различных представителей высших растений и водорослей, так и у ряда бактерий, например, *Chromatium* и *Rhodospirillum*, предполагается, что многим бактериям свойственна только одна фотосистема, аналогичная фотосистеме I. Наиболее существенным доводом в пользу этого послужило отсутствие эффекта Эмерсона у некоторых микроорганизмов.

Донором электронов у серобактерий являются различные соединения серы. Первичная фотохимическая реакция бактериального фотосинтеза заключается в обратимом окислении бактериохлорофилла P_{870} — P_{890} , входящего в состав реакционного центра и составляющего около 2% от всего пигментного фонда. Транспорт электронов от донора к НАД осуществляется с помощью набора переносчиков, в число которых входят различные

цитохромы, убихиноны и ферредоксин. Среди них особое значение, по данным А. Б. Рубина, имеют низкопотенциальные ($C_{423,5}$ и C_{552}) и высокопотенциальные (C_{422} и C_{555}) цитохромы, которые обеспечивают нециклический и циклический транспорт электронов соответственно. Предполагается, что оба типа цитохромов связаны с одним и тем же бактериохлорофиллом реакционного центра (рис. 22). Природа первичного акцептора электронов в цепи транспорта точно не установлена, хотя и высказывались предположения, что в его роли может выступать витамин K_2 (нафтохинон).

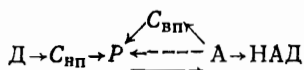


Рис. 22. Схема первичных процессов бактериального фотосинтеза (Рубин А.Б., 1975)

С помощью лазерной импульсной спектроскопии удалось оценить время окисления бактериохлорофилла и восстановления первичного акцептора электронов, которое составляет величину порядка 10^{-11} с ($\tau_{1/2}$). Восстановление окисленного реакционного центра происходит при помощи электронов цитохромов за несколько микросекунд.

Основными продуктами бактериального фотосинтеза, запасующими энергию, являются АТФ и НАДН₂, которые и используются клеткой для темнового синтеза органических соединений.

Таким образом, на примере бактериального фотосинтеза мы можем видеть черты общности на фоне многообразия механизмов фотосинтетических процессов.

12. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЗАПАСАНИЯ ЭНЕРГИИ СВЕТА НА СТАДИИ ТРАНСПОРТА ЭЛЕКТРОНОВ

Сопряжение окислительно-восстановительных превращений хлорофилла с направленным электронным потоком характеризуется поразительно высокой эффективностью. При квантовом расходе фотосинтеза $8h\nu/O_2$ практически каждый поглощенный пигментом квант све-

та приводит к перемещению электрона в одном из участков цепи переносчиков. Иными словами, практически *ни один из поглощенных в крайне сложной и гетерогенной фотосинтетической системе квантов не пропадает даром, и квантовый выход первичной фотохимической реакции $e/h\nu$ равен 1*. Следует особо подчеркнуть, что даже в такой простой двухкомпонентной системе, как аскорбиновая кислота — хлорофилл, реакция Красновского протекает с квантовым выходом, не превышающим 0,01. Это означает, что для переноса одного электрона от донора к акцептору необходимо поглощение, по крайней мере, 10 квантов света.

Столь высокая эффективность фотосинтетического аппарата обусловлена, по-видимому, *идеальным пространственным соответствием* между сближенными центрами донор — хлорофилл — акцептор, т. е. крайне удачным подбором донор-акцепторных пар или же полупроводниковыми свойствами материала, отделяющего хлорофилл от окислительно-восстановительных головок переносчиков электронов. Действительно, окисление переносчиков электронов (цитохромов в бактериях и высших растениях) проходит при крайне низких температурах: -150 , -196 и даже -269°C . Следовательно, этот процесс не требует энергии активации и соударений и имеет преимущественно физическую природу.

Важнейшим звеном, в котором происходят стабилизация и сопряжение быстрых фотофизических актов с медленными биохимическими, являются ловушки, входящие в состав реакционных центров.

Изучая длительное послесвечение и низкотемпературную термолюминесценцию фотосинтезирующих организмов, Ф. Ф. Литвин пришел к выводу о существовании в хлоропластах энергетических ловушек нескольких типов и даже рассчитал их глубину, константы скоростей захвата и освобождения энергии, сечение захвата. Одна из ловушек (глубина 0,16 и 0,35 эВ) включена в коротковолновую, другая (0,9 эВ) — в длинноволновую пигментную систему.

Как следует из всего изложенного, *основными продуктами, в которых консервируется энергия света в ходе окислительно-восстановительных стадий фотосинтеза, являются АТФ (универсальный биохимический источник*

энергии) и НАДФН₂ (источник энергии и «восстановительной силы», т. е. реактивного «горячего» водорода). В результате следующих темновых чисто ферментативных стадий фотосинтеза (цикл Кальвина) именно из этих двух веществ и СО₂ строятся органические молекулы, прежде всего углеводы.

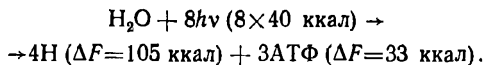
Как станет ясным из дальнейшего изложения, по схеме Кальвина для «элементарного синтеза» (радикал СН₂О) требуется две молекулы НАДФН₂ и три молекулы АТФ. Естественно, что согласованная работа двух фотосистем должна находиться в стехиометрических соотношениях с циклом Кальвина и давать на каждые восемь квантов, кроме одной молекулы О₂, две молекулы НАДФН₂ и три молекулы АТФ. Для образования двух молекул НАДФН₂ теоретически (исходя из Z-схемы) необходимо четыре «горячих» электрона. Для того, чтобы они образовались, каждая из фотосистем должна поглотить по четыре кванта света (итого восемь квантов). Действительно, для хлоропластов шпината выполняется соотношение [О₂]/[ферредоксин восст.] = 1/4. В лаборатории Аврона было установлено, что квантовый расход полуреакции образования НАДФН₂ (НАДФ + 2e + 2H⁺ → → НАДФН₂) при 640 нм равен 2,5, а при 715 нм в присутствии экзогенного донора электронов (аскорбиновая кислота) — 1. Все это удовлетворительно согласуется с Z-схемой.

Менее определенно дело обстоит с АТФ. Еще неясно, на каких участках электронного каскада она образуется. Равновероятны следующие возможности: 1) все три молекулы АТФ образуются в результате нециклического фосфорилирования; 2) одна молекула АТФ образуется в результате нециклического и две — в результате циклического фосфорилирования; 3) все три молекулы АТФ образуются в результате циклического фосфорилирования.

Указанная неопределенность связана прежде всего с тем обстоятельством, что до сих пор не удалось определить квантовые выходы циклического и нециклического фосфорилирования в естественных условиях.

Наиболее адекватной проверкой Z-схемы, вероятно, послужили бы опыты по прецизионному и одновременно измерению квантовых расходов выделения О₂, образования АТФ, НАДФН₂ и ассимиляции СО₂ на одном и том

же объекте в строго одинаковых условиях на свету различного спектрального состава. К сожалению, опыты подобного рода никем до сих пор не проведены. Тем не менее, независимо от конкретной природы превращений вещества на окислительно-восстановительной стадии фотосинтеза, можно оценить коэффициент полезного действия итогового превращения свет → промежуточные продукты:



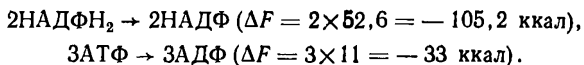
Из реакции видно, что к.п.д. = $(138 \cdot 100) / 320 = 43\%$.

Итак, с точки зрения утилизации квантов света фотосинтез представляет собой идеальный процесс: практически ни один квант света не диссипирует в тепло, а каждый из них инициирует антитермодинамический подброс электрона. Следовательно, элементарный акт фотосинтеза можно рассматривать как одноквантовый, одноударный процесс. Это отнюдь не означает, что вся энергия поглощенных квантов преобразуется в энергию АТФ и НАДФН₂ (напомним, что квантовый и энергетический выход процесса неравнозначны друг другу).

По мере чередования событий в пределах фотофизических и электронно-транспортных стадий процесса молекулярная фотосинтетическая система сохраняет в себе все меньшую и меньшую часть свободной энергии, полученной ею от кванта света.

13. ФЕРМЕНТАТИВНАЯ ТЕМНОВАЯ СТАДИЯ ФОТОСИНТЕЗА (МЕТАБОЛИЗМ УГЛЕРОДА)

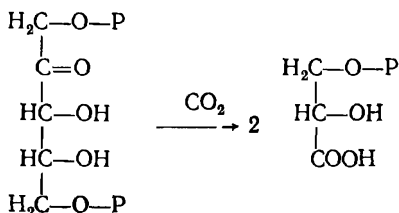
Из всего изложенного следует, что основным результатом фотофизических, фотохимических и электронно-транспортных стадий фотосинтеза является образование АТФ и НАДФН₂. Грубо говоря, в темноте можно, по-видимому, обеспечить нормальное развитие растений, имитируя фотосинтез подкормкой растительных организмов продуктами фотофизической, фотохимической и электронно-транспортной систем фотосинтеза — АТФ и НАДФН₂. Именно при участии этих веществ и СО₂ энзиматическим темновым путем синтезируются конеч-



В результате коэффициент полезного действия цикла Кальвина составляет $(112 \cdot 100)/138 = 81\%$.

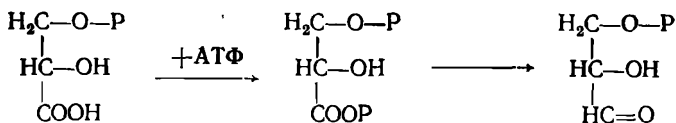
Акцентируем внимание читателя на узловых стадиях цикла Кальвина.

1. *Включение в цикл CO_2 .* Акцептором CO_2 является рибулозо-1,5-дифосфат, содержащий пять углеродных атомов. В ходе восстановительного карбоксилирования рибулозо-1,5-дифосфата образуются две молекулы 3-фосфоглицериновой кислоты:



Эта реакция в целом экзергонична (самопроизвольна) благодаря энергии превращения макроэргической связи в рибулозо-1,5-дифосфате в обычную.

2. *Включение в цикл четырех атомов водорода.* Активированный водород вводится в цикл с помощью двух молекул НАДФН₂ ($\Delta F = 2 \times 52,6$ ккал), а само восстановление, сопряженное с затратой энергии двух молекул АТФ, сводится к превращению 3-фосфоглицериновой кислоты (через 1,3-дифосфоглицериновую кислоту) в триозофосфат (глицеральдегид-3-фосфат):

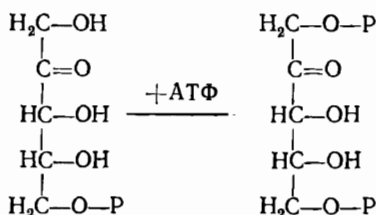


Эта, по крайней мере, двухстадийная реакция также в целом экзергонична.

3. *Путь восстановления углерода.* Конденсация двух молекул триозофосфата дает радикал CH_2O (1C) и рибулозо-5-монофосфат (5C) или $2(3\text{C}) = 1\text{C} + 5\text{C}$. Для обра-

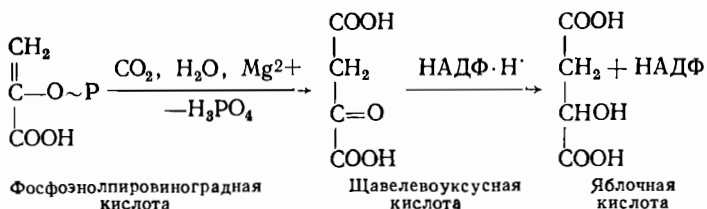
зования молекулы глюкозы ($6C$) требуется, следовательно, шестикратное обращение цикла: $6 \times (CH_2O) = C_6H_{12}O_6$.

4. *Замыкание цикла (регенерация рибулозодифосфата)*. Рибулозо-5-монофосфат, образующийся несколькими ферментативными путями из двух молекул триозофосфата ($2C + 3C = 5C$), фосфорилируется с помощью АТФ до рибулозо-1,5-дифосфата — первичного акцептора CO_2 в цикле Кальвина:



Таким образом, из трех молекул АТФ две используются на стадии фосфорилирования двух молекул 3-фосfogлицириновой кислоты, а одна — на регенерационной стадии цикла при превращении рибулозо-5-монофосфата в рибулозо-1,5-дифосфат. Обе молекулы НАДФН₂ используются на восстановительной стадии цикла — превращение 1,3-дифосfogлицириновой кислоты в глицеральдегид-3-фосфат.

Известно, что цикл Кальвина связан побочными ветвями с другими метаболическими путями и циклами, например, с циклом C_4 -дикарбоновых кислот (цикл Хетча—Слэка). В основе представлений об этом цикле лежит следующий экспериментальный факт. У некоторых тропических злаковых в первые секунды фотосинтеза меченый углерод включается не в фосfogлицириновую кислоту и сахара, а в органические кислоты — щавелевоуксусную и яблочную. При этом в них обнаруживается до 80% поглощенной метки. Появление меченого углерода в фосfogлицириновой кислоте и фосфорилированных сахарах можно зарегистрировать только через 5—10 мин. Показано, что первичным акцептором CO_2 является фосфоэнолпировиноградная кислота, претерпевающая ряд последовательных ферментативных превращений:



В ходе восстановительного аминирования щавелевоуксусная и яблочная кислоты превращаются в аминокислоты. В свою очередь щавелевоуксусная и яблочная кислоты могут декарбоксилироваться с образованием пировиноградной кислоты, которая затем регенерирует в фосфоэнолпировиноградную кислоту. Освобождающийся же при декарбоксилировании CO_2 фиксируется в цикле Кальвина. Таким образом, цикл C_4 -дикарбоновых кислот представляет собой своеобразный метаболический путь, с помощью которого определенная доля поглощенного растением CO_2 утилизируется для нужд белкового синтеза.

Следует отметить, что растения с C_4 -способом фиксации CO_2 имеют по сравнению с C_3 -растениями (утилизирующими CO_2 с помощью реакций цикла Кальвина) ряд преимуществ, особенно в условиях жаркого тропического климата и водного дефицита. Основное из них заключается в том, что у C_4 -растений первичное связывание CO_2 осуществляется ферментом фосфоэнолпируваткарбоксилазой, обладающей значительно большим сродством к CO_2 ($K_m = 7 \text{ мкМ}$), чем рибулозодифосфаткарбоксилаза у C_3 -растений ($K_m = 450 \text{ мкМ}$). Благодаря этому и некоторым анатомическим особенностям, направленным на концентрирование CO_2 у фотосинтезирующих клеток, C_4 -растения получают возможность аккумулировать CO_2 без больших потерь воды (и энергии) при транспирации и «полузакрытых» устьицах. Возможно, прежде всего по этой причине сахарный тростник является одним из «рекордсменов» по фотосинтетической продуктивности, превосходя в этом отношении другие растения C_3 -типа в 2—3 раза.

Природа конечных продуктов, образующихся на заключительных стадиях фотосинтеза, зависит от ряда факторов: спектрального состава света, условий внешней

среды и физиологического состояния растения. Например, синий свет способствует образованию аминокислот и других азотсодержащих соединений: при сильном снижении парциального давления CO_2 в атмосфере и высокой освещенности начинает функционировать так называемый гликолатный путь образования углеводов; в зависимости от физиологического состояния одна и та же культура хлореллы может продуцировать то более 30% аминокислот, то более 30% липидов.

По всей видимости, эти различия в природе конечных продуктов связаны не с перестройками на уровне фотохимических и электронно-транспортных стадий фотосинтеза, а с регуляторными изменениями на стадиях темновых ферментативных реакций, возможно, за пределами цикла Кальвина или даже с использованием иных синтетических механизмов. Действительно, сдвиг в сторону образования аминокислот у хлореллы под влиянием синего света сохраняется в присутствии диурана и происходит при каталитических интенсивностях света с длиной волны 453 нм.

14. РОЛЬ МЕМБРАННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА

В настоящее время твердо установлено, что фотосинтетические пигменты и прежде всего хлорофилл так или иначе ассоциированы с мембранной системой хлоропластов. В мембранной системе локализована также электронно-транспортная цепь фотосинтеза (на каждый тилакоид приходится около 200 цепей).

Мембранная организация имеет огромное значение для протекания фотохимических и электронных стадий фотосинтеза, с одной стороны, и регуляции фотосинтетической активности,— с другой. Прежде всего мембраны обеспечивают пространственную близость и стереометрически-функциональное соответствие между пигментами и переносчиками электронов, необходимые для эффективной работы фотосинтетического аппарата. Таким путем достигается практически 100-процентный квантовый выход первичной фотохимической реакции, причем константа ее скорости должна значительно превосходить кон-

станты скорости дезактивации электронно-возбужденного состояния хлорофилла реакционного центра при люминесценции и диссипации электронной энергии в тепло. Стереометрия расположения переносчиков электронов в мембранах в норме предотвращает их утечку на посторонние акцепторы и сводит до минимума электронные потери на обоих нисходящих электронных каскадах. По-видимому, высокая эффективность работы электронно-транспортной цепи обеспечивается туннельными эффектами между переносчиками электронов. Известно, что каждый из переносчиков электронов может отдавать электрон кислороду (аутоокисление). Это, однако, как правило, в хлоропластах не происходит. *Вследствие упорядоченного взаиморасположения различных переносчиков в мембране хлоропластов создаются условия для направленного и эффективного транспорта электронов.*

Не исключено также, что рассмотренная выше Z-схема не исчерпывает сложных взаимоотношений между пигментными системами и переносчиками электронов, возникающих в ходе работы реальной фотосинтетической машины. В последние годы получены экспериментальные доказательства энергетических взаимодействий между соседними фотосинтетическими единицами: выявляется миграция энергии между субъединицами обеих систем. Все больше аргументируются и представления о том, что существует несколько путей (электронных каскадов) от воды к фотосистеме I. Электроны могут переноситься от фотосистемы II к фотосистеме I не по одной, а по нескольким параллельным цепочкам переносчиков. В то же время фотосистема I, по-видимому, способна питаться электронами, поступающими от нескольких (например, четырех) фотосистем II. Эффективный контроль скорости транспорта электронов осуществляется также с помощью специальных электронных «емкостей». Как показали исследования А. Б. Рубина, из общего, представленного в хлоропластах, пластохинона в реакциях транспорта участвует только около 10—20%, а остальные 80—90% используются тогда, когда в этом возникает острая необходимость. Благодаря такому резерву восстановленного пластохинона в цепи транспорта электронов постоянно поддерживается стабильное редокс-состояние переносчи-

ков. К числу других факторов, контролирующих скорость транспорта электронов, нужно отнести конформационное состояние отдельных переносчиков, от которого зависит интенсивность межмолекулярных взаимодействий между компонентами цепи транспорта. По-видимому, на основе оптимизации межмолекулярных взаимодействий достигается наиболее удачная с точки зрения «сброса» и «усвоения» электрона компоновка отдельных элементов цепи.

Вследствие сложного характера миграционных и электронно-транспортных взаимоотношений между структурными элементами, размещенными в мембране, фотосинтетическая «машина» приобретает черты статическо-динамической системы, в которой для энергии кванта света обычно находится канал утилизации: если «свой» загружен, закрыт «переработкой» предыдущего кванта, будет использован параллельный или соседний канал. Так сформировались представления о так называемой *мультицентральной модели* фотосинтетических единиц. Согласно этой модели, достаточно большое число взаимодействующих между собой фотохимических центров включено в единую систему пигментов-светосборщиков и цепей транспорта электронов, в которой каждый центр равновероятно конкурирует за квант поглощенного света.

В противоположность этому в постулированной ранее *уницентральной модели* каждый фотохимический центр постоянно обслуживается только своим определенным пигментным фондом светосборщиков. Первые экспериментальные доказательства в пользу мультицентральной модели были получены в 1963 г. Вреденбергом и Дюйсенсом, которые обнаружили гиперболический характер зависимости между величиной квантового выхода флуоресценции и степенью окисленности фотохимических центров.

В дальнейшем П. Жолио и А. Жолио при изучении скорости выделения кислорода в зависимости от степени закрытия реакционных центров фотосистемы II у хлореллы получили дополнительные доказательства мультицентрального функционирования фотосистемы II.

Л. А. Тумерман и Е. М. Сорокин обнаружили пропорциональность между квантовым выходом и временем жизни флуоресценции хлорофилла у хлореллы на всем протяжении индукционного периода (период, в течение

которого скорость фотосинтеза у перенесенного из темноты на свет растения возрастает).

Мультицентральное строение фотосинтетического аппарата свойственно не всем организмам. Фокс и Амеш исследовали зависимость скорости выделения кислорода от степени окисленности P_{700} у красной водоросли *Cryptopleura violacea* и сине-зеленой водоросли *Porphyra perforata*. Оказалось, что для первого объекта справедлива мультицентральная, для второго — уницентральная модель.

Наконец, Е. М. Сорокин на основании анализа кинетики индукции флуоресценции у хлоропластов гороха пришел к выводу о мультицентральной природе фотосистемы II. Характерно, что в присутствии критической концентрации моноурона наблюдался обратимый переход от мультицентральной к уницентральной модели. Этот переход осуществляется по кооперативному закону (принцип «все или ничего»). По-видимому, причиной перехода является структурная перестройка мембраны хлоропласта. Такое поведение хлоропластов характеризует их не как *статическую* (или только уницентральную, или только мультицентральную), а как *динамическую систему*, способную к обратимым переходам в соответствии с особенностями внешней среды.

Становится все более очевидной и конформационная лабильность мембран, управляемая, видимо, и светом. Это придает фотосинтетическому аппарату черты *самонастраивающейся системы*, в которой может резко изменяться мозаика взаимодействий между фотосистемами I и II.

Косвенным подтверждением способности мембран к структурным перестройкам является высокая чувствительность хлоропластов к таким факторам внешней среды, как солевой состав, pH и освещение. Хлоропласт, по-видимому, не является простой осмотической ячейкой, поскольку монотонное повышение осмолярности среды вызывает то набухание, то сокращение его объема. Характерно, что способность к набуханию сильно зависит от концентрации водородных ионов. Минимальное набухание наблюдается при $pH=3,5$, т. е. при изoeлектрической точке структурных белков. Все это наводит на мысль о потенциальной способности хлоропластов пре-

бывать в нескольких структурных модификациях, осуществляемых, возможно, при участии мембранных белков.

Еще более важно, что низкоамплитудные (порядка 15%) изменения объема хлоропластов происходят как непосредственно в листьях, так и в суспензии при освещении, т. е. при запуске процессов транспорта электронов и фотофосфорилировании. В ряде работ обнаружено, что ингибиторы фотофосфорилирования тормозят и обмен ионов на свету у изолированных хлоропластов, и их сжатие. При этом процессами фосфорилирования контролируется не только сравнительно медленный процесс высокоамплитудного набухания, протекающий в темноте и ускоряющийся светом, но и низкоамплитудное сжатие. Светоиндуцированное сжатие сопровождается выбросом K^+ из хлоропластов, причем оба явления имеют одинаковую кинетику и тормозятся нигерицином и другими ингибиторами фотофосфорилирования.

Набухание и сжатие хлоропластов связаны, по-видимому, с глубокими структурными перестройками на молекулярном уровне. Об этом говорит уже тот факт, что максимуму набухания соответствует 73%-ное уменьшение фотофосфорилирования и угнетение большинства фотохимических реакций, за исключением фотовосстановления феррицианида. Систематические исследования В. М. Иванченко показали, что зависимость функциональной активности хлоропластов (например, выделение кислорода, циклическое фотофосфорилирование) от их объема описывается куполообразной кривой, т. е. максимальной активности соответствует определенный оптимальный объем органеллы.

Обнаружено также, что светоиндуцированные изменения объема хлоропластов приводят к ультраструктурным перестройкам в ламеллярных структурах органелл, о чем свидетельствуют данные электронной микроскопии. При освещении хлоропластов отмечаются сглаживание рельефа мембранных систем и обратимые изменения толщины, показателя преломления и электронной плотности мембран.

На функциональную роль индуцированных светом перестроек указывают и следующие факты. При освещении фотосинтезирующих объектов наблюдается сложная

полиэкстремальная зависимость скорости выделения кислорода, приходящегося на один световой импульс (флеш) или одну молекулу хлорофилла 2, от числа флешей в серии.

Согласно Жолио и Ренжеру, кванты, поглощенные хлорофиллом, инициируют конформационные превращения металло- (Mn^{2+})-протеидов Z-участков мембраны, ответственных за фотолиз воды и перенос электрона к Q, тем самым влияя на их функциональную активность. Ренжер построил сложную кинетическую схему фотолиза воды, основанную на четырех конформационных состояниях, каждое из которых, по его мнению, обладает различной окислительно-восстановительной активностью. Свет, поглощаемый хлорофиллом 2, вызывает взаимопревращение этих состояний. В результате Ренжеру удалось достичь хорошего совпадения расчетной и экспериментальной кривых выделения кислорода как функции числа последовательных флешей. Предполагается, следовательно, что до тех пор, пока не произойдут сенсibilизированные хлорофиллом конформационные перестройки в мембране, фотосинтетический аппарат будет работать в неоптимальном режиме.

Перестройка структурно-функционального состояния мембран хлоропласта при включении фотосинтетической «машины» следует также из фотоиндуцированных изменений потенциала мембраны отдельного хлоропласта, зарегистрированного Ф. Ф. Литвиным с помощью микроэлектродной техники.

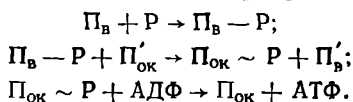
На тесную взаимосвязь между интенсивностью электронного транспорта в изолированных хлоропластах и конформационным строением мембранной системы указывают опыты, в которых зарегистрировано изменение конформации (данные светорассеяния и электронной микроскопии) при включении и выключении электронного каскада светом.

В мембранном аппарате локализовано (и это очень важно) сопряженное с транспортом электронов фосфорилирование, по существу близкое к окислительному фосфорилированию в митохондриях. Есть основания думать, что механизм сопряжения между окислением и фосфорилированием осуществляется с помощью мембран.

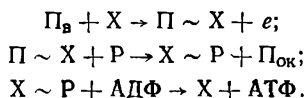
Несмотря на огромное количество экспериментальных

работ в области биоэнергетики, до сих пор окончательно не разрешен вопрос о том, каким образом свободная энергия, заключенная в восстановленном переносчике электронов, используется при синтезе АТФ и каков механизм сопряжения электронного транспорта и фосфорилирования.

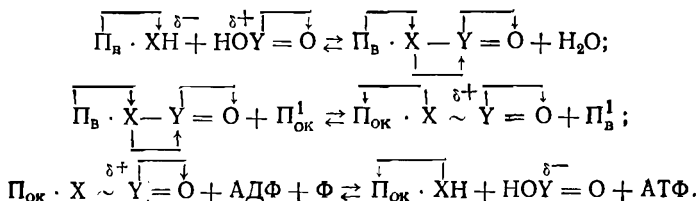
К наиболее ранним представлениям о сопряжении транспорта электронов с фосфорилированием можно отнести гипотезу химического сопряжения. В первоначальном варианте (Липман) эта гипотеза предполагала, что восстановленный переносчик электронов образует ковалентную связь с неорганическим фосфатом, которая в дальнейшем за счет энергии, выделяющейся при окислении переносчика, становится макроэргической:



Усложнением схемы Липмана явилась схема Слейтера, по которой восстановленный переносчик взаимодействует не с минеральным фосфатом, а с промежуточным фактором сопряжения X:



Наконец, была выдвинута идея о трехкомпонентной схеме химического сопряжения, согласно которой с восстановленным переносчиком взаимодействуют два фактора сопряжения (ХН и НОУ=О), при этом они не вступают в ковалентную связь с переносчиком, а макроэргическая связь образуется за счет индукционного перемещения электронной плотности в системе восстановленный — окисленный переносчик + фактор сопряжения:



Однако все перечисленные схемы представляют лишь исторический интерес, поскольку ни один из первичных макроэргических интермедиатов типа $P \sim R$, $P \sim X$, $X \sim Y = O$ не был выделен из трансформирующих энергию мембран.

В настоящее время наибольшей популярностью пользуются две гипотезы сопряжения: хемиосмотическая Митчела и конформационная.

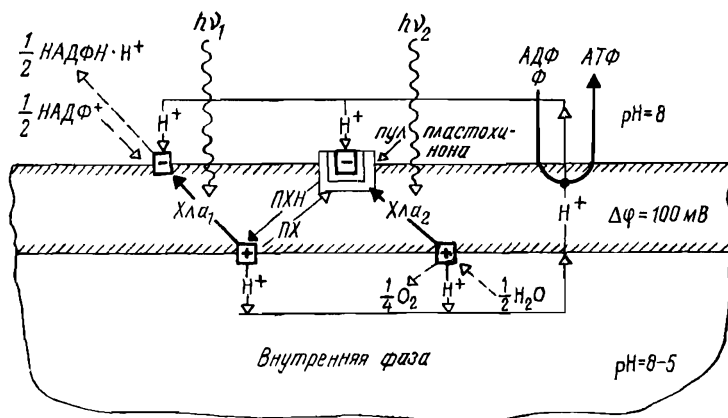
По хемиосмотическому механизму превращение различных форм энергии осуществляется следующим образом: окислительно-восстановительная энергия переносчиков $\rightarrow$ энергия электрохимического градиента протонов $\rightarrow$ энергия АТФ. Гипотеза основывается на нескольких предпосылках: 1) мембрана непроницаема для воды и протонов; 2) мембрана разделяет реакционное пространство на внешнее и внутреннее; 3) в ее состав входят переносчики электронов, обеспечивающие асимметрическое распределение протонов по обе стороны мембраны; 4) цепь транспорта расположена поперек мембраны.

В конечном счете в ходе окислительно-восстановительных превращений переносчиков на внутренней стороне мембраны тилакоида постепенно накапливаются протоны и возникает мембранный протонный потенциал. Градиент pH между внутренней и внешней фазами тилакоида составляет, по данным Ягендорфа, примерно 2,7, а мембранный потенциал 50 мВ. Процесс фосфорилирования сопровождается перераспределением ионов H^+ , противоположным тому, которое возникает при транспорте электронов. По Митчелу, для синтеза одной молекулы АТФ из АДФ и неорганического фосфата достаточно перемещения через мембрану двух протонов (см. схему). Предполагается, что при этом за счет энергии мембранного потенциала происходит активация фермент-субстратного комплекса АТФ-синтетазы, или, как ее называют в последнее время, протонной АТФ-азы.

В пользу хемиосмотической гипотезы говорят следующие факты: 1) существование протонного мембранного потенциала и зависимость его от интенсивности транспорта электронов; 2) корреляция между эффективностью действия разобщителей на фосфорилирование и протонную проницаемость мембран; 3) синтез АТФ хлоропластами в темноте при искусственном создании

pH-градиента (быстрое перемещение хлоропластов из среды с $pH=4,0$ в среду с $pH=8,5$).

Все же гипотезу Митчела нельзя считать окончательно доказанной. Более того, некоторые экспериментальные данные находятся с ней в явном противоречии. Например, по данным Нишимуры и Мак-Карти, время химической



релаксации для фосфорилирования значительно короче, чем для поглощения протонов (10^{-1}с); фиксированные глутаровым альдегидом хлоропласты поглощают протоны, но не синтезируют АТФ. Согласно расчетам Н. М. и Д. С. Чернавских, в условиях импульсного освещения, когда ΔpH отсутствует, а $АТФ/2e=2$ и $H^+/e=2$, одной энергии мембранного потенциала недостаточно для обеспечения наблюдаемого синтеза (АТФ), т. е. имеет место примерно пятикратный дефицит энергии.

Согласно *конформационному* (механохимическому) механизму сопряжения, последовательность превращения энергии выглядит следующим образом: окислительно-восстановительная энергия переносчика $\rightarrow$ механическая (конформационная) энергия $\rightarrow$ энергия АТФ.

Предполагается, что выделяемая при транспорте электронов энергия первоначально запасается в виде упругих стерических деформаций мембраны. Эта конформационная энергия и активирует фермент-субстратный комплекс АТФ-синтетазы. В целом такой процесс напоминает обра-

шенную реакцию мышечного сокращения, при котором энергия АТФ через структурные перестройки контрактильных белков трансформируется в механическую.

Как и хемиосмотическая, конформационная гипотеза не является окончательно доказанной, хотя в ее пользу и говорят некоторые факты. Конформации белковых носителей окисленных и восстановленных переносчиков различаются между собой. При запуске транспорта электронов в мембранах наблюдаются структурные перестройки митохондрий и хлоропластов, регистрируемые по сокращению их объема. Установлено, что конформационные перестройки хлоропластов происходят только в том случае, если транспорт электронов сопряжен с фосфорилированием. В присутствии ингибиторов фосфорилирования сокращения объема хлоропластов не наблюдается.

В хлоропластах удалось обнаружить ряд так называемых сопрягающих белков (CF_1 , CF_2 , CF_c), без которых синтез АТФ из АДФ и фосфата не возможен. Полагают, что сопрягающие белки участвуют в терминальных стадиях синтеза АТФ и входят в состав мембранных комплексов, ответственных за транслокацию протонов. Так, например, сопрягающий фактор CF_1 представляет собой белок, состоящий из пяти субъединиц α , β , γ , δ , ϵ . При этом основные функции сопряжения оказались связанными с α - и γ -субъединицами, формирующими активный центр CF_1 — место связывания АДФ. Характерно, что конформация сопрягающего белка CF_1 определяется исходным состоянием мембраны хлоропластов. Включение трития в CF_1 у освещенных (энергизированных) хлоропластов идет более эффективно, чем у хлоропластов, находящихся в темноте.

Анализ последних работ показывает, что в основе функциональной активности CF_1 лежат индуцированные светом конформационные изменения его отдельных субъединиц. Наиболее вероятно, что подобные перестройки являются следствием структурного перехода в мембране хлоропласта и (или) в переносчиках электронов (свет поглощается хлорофиллом). Постулируется несколько конформационных состояний CF_1 : S_0 -состояние, соответствующее находящимся в темноте хлоропластам, S_1 - и S_2 -состояния, возникающие при энергизации хлоропластов (освещение или кислотно-основные переходы), S_3 -

состояние, возникающее на свету при добавлении к хлоропластам АДФ, S_4 - и S_5 -химически модифицированные конформеры S_3 .

Тем не менее, несмотря на отсутствие однозначной схемы сопряжения транспорта электронов с фосфорилированием, определяющая роль мембран в этом процессе не вызывает сомнения. Действительно, синтез АТФ до сих пор не удалось воспроизвести в растворе при наличии всех необходимых исходных ингредиентов. В то же время самые разнообразные химические и физические воздействия, нарушающие интактную структуру мембран, приводят к разобщению между окислением переносчиков электронов и фосфорилированием.

Подводя итог сказанному, следует подчеркнуть многообразие проявления ведущей роли мембран в работе фотосинтетического аппарата. Практически все стадии фотосинтетического процесса, начиная с поглощения света и кончая образованием стабильных продуктов, контролируются структурным состоянием мембраны. В мембране предусмотрено не только правильное пространственное размещение согласованно взаимодействующих элементов, но и возможность регуляции эффективности как всего процесса в целом, так и отдельных реакций через ее структурное состояние.

15. МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ФОТОСИНТЕЗА

Контроль за работой фотосинтетического аппарата осуществляется с помощью нескольких уровней регуляции. Один из них — мембранный — рассмотрен в предыдущем параграфе. С мембранным уровнем регуляции связаны относительно быстрые перестройки эффективности и направленности фотосинтетического процесса.

К более медленным регуляторным реакциям следует отнести приспособительные адаптационные реакции фотосинтезирующих организмов к измененным условиям среды. В этом случае приобретает особое значение *управление биогенезом* фотосинтетических мембран и отдельных молекулярных компонент хлоропластов. Твердо установлено, что в хлоропластах содержится относительно автономный аппарат для биосинтеза белка: ДНК, все виды РНК, рибосомы, полисомы. В хлоропластах обна-

ружены также ферменты, катализирующие редупликацию ДНК и синтез информационной РНК на ДНК.

Структура белков хлоропластов запрограммирована не только в ДНК хлоропластов, но и в ДНК ядра. Предполагается, что ДНК хлоропласта контролирует в основном формирование мембранной системы, а ДНК ядра — в основном формирование стромы.

Совершенно очевидно, что активация биосинтеза белков на уровне транскрипции или трансляции может привести к значительному увеличению валового продукта фотосинтеза, а индукция специфических белков, например, ферментов цикла Кальвина — к изменению его качественного состава.

Как и любой другой биологической системе, фотосинтетическому аппарату свойствен *метаболический тип* регуляции, основанный на *изо- и аллостерическом* активировании и ингибировании ферментов промежуточными и конечными продуктами метаболизма. Подобные механизмы участвуют, с одной стороны, в регуляции синтеза пигментов и кофакторов (НАДФ, ФАД), с другой — в работе темнового биохимического аппарата самого фотосинтеза (цикл Кальвина).

Типично регуляторными ферментами в цикле Кальвина являются рибулозодифосфаткарбоксилаза, альдолаза, седогептулозодифосфатаза. Восстановленный ферредоксин в свою очередь активизирует альдолазу. Поскольку он образуется на свету в пределах фотосистемы I, то активацию альдолазы можно рассматривать как светозависимую регуляторную реакцию.

Таким образом, *фотосинтетический аппарат представляет собой характерный пример самонастраивающейся, саморегулирующейся системы.*

Рекомендуемая литература

Борисов А. Ю. Энергетика фотосинтеза (от кванта света до химических реакций). — Успехи соврем. биол., 1969, 68, 210.

Воскресенская Н. П. Фотосинтез и спектральный состав света. М., 1965.

Годнев Т. Н. Хлорофилл. Его строение и образование в растении. Минск, 1963.

Гродзинский Д. М. Биофизика растения. Киев, 1972.

Гуринович Г. П., Соловьев К. Н., Севченко А. Н. Спектроскопия хлорофилла и родственных соединений. Минск, 1965.

Евстигнеев В. Б. О фотохимическом взаимодействии хлорофилла и его аналогов с акцепторами электрона. — В кн.: Молекулярная фотоника. Л., 1970, с. 178.

Калер В. Л. Авторегуляция образования хлорофилла в высших растениях. Минск, 1976.

Красновский А. А. Фотохимия хлорофилла и молекулярная организация пигментной системы организмов. — В кн.: Функциональная биохимия клеточных структур. М., 1970, с. 15.

Красновский А. А. Преобразование энергии света при фотосинтезе. Молекулярные механизмы. М., 1974.

Кутюрин В. М. О механизме разложения воды и выделения кислорода в процессе фотосинтеза. — Успехи соврем. биол., 1965, 59, 205.

Литвин Ф. Ф. Биофизические механизмы фотосинтеза и других фотобиологических процессов. — В кн.: Биофизика. М., 1968, с. 315.

Рубин А. Б., Кренделева Т. Е. Фотосинтетический перенос электронов и сопряженные с ним процессы фосфорилирования у растений. — Успехи соврем. биол., 1972, 73, 364.

Рубин А. Б., Гавриленко В. Ф. Биохимия и физиология фотосинтеза. М., 1977.

Скулачев В. П., Козлов И. А. Протонные аденозинтрифосфатазы. М., 1977.

Современные проблемы фотосинтеза. М., 1973.

Тарчевский И. А. Основы фотосинтеза. Казань, 1971.

Фотохимические системы хлоропластов. Киев, 1975.

Хлорофилл. Минск, 1974.

Чернавская Н. М., Чернавский Д. С. Туннельный транспорт электронов в фотосинтезе. М., 1977.

Шлык А. А. Метаболизм хлорофилла в зеленом растении. Минск, 1964.

Boardman N. The photochemical systems of photosynthesis. — Ann. Rev. Plant Physiol., 1970, 21, 115.

Clayton R. Physical mechanisms in photosynthesis: past elucidation and current problems. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 44.

Park R., Sane P. Distribution of function and structure in chloroplast lamella. — Ann. Rev. Plant Physiol., 1971, 22, 395.

Rabinowitch E. Photosynthesis. N. Y., 1969.

Vernon L., Shaw E., Ogawa I., Raveed D. Structure of photosystem I and photosystem II of plant chloroplasts. — Photochem. and Photobiol., 1971, 14, 343.

Witt H. Primary acts of energy conservation in the functional membrane of photosynthesis. — In: Bioenergetics of photosynthesis. N. Y., 1975, 495.

Глава V. БАКТЕРИОРОДОПСИНОВЫЙ ФОТОСИНТЕЗ МАКРОЭРГОВ

До недавнего времени фотосинтез считался единственным процессом на Земле, с помощью которого живые существа утилизировали для своих нужд энергию солнеч-

ного света. Однако в последнее десятилетие эта догма была пересмотрена: обнаружен бактериородопсиновый фотосинтез макроэргов, принципиально отличающийся своим механизмом от обычного фотосинтеза. Вместе с тем следует сразу отметить, что открытие этого фотоэнергетического процесса ни в коей мере не может ревизовать представление о доминирующей роли фотосинтеза в обеспечении энергией биосферы. Дело в том, что бактериородопсиновый фотосинтез макроэргов представлен только у одной группы микроорганизмов — галофильных бактерий, которые к тому же могут покрывать свои энергетические нужды и как гетеротрофы (за счет окисления органических субстратов). В чем же суть бактериородопсинового фотосинтеза макроэргов?

Установлено, что свет, поглощаемый бактериородопсином галофильных бактерий (*Halobacterium halobium*), через создание электрохимического градиента протонов у плазматических мембран без участия цепи переносчиков электронов приводит к синтезу АТФ, благодаря чему достигается трансформация световой энергии в химическую: $\text{свет} \rightarrow \Delta\mu_{\text{H}^+} \rightarrow \text{АТФ}$.

H. halobium погибает в средах, содержащих менее 3,0 М NaCl; в растворах с низким содержанием солей происходит фрагментация плазматических мембран микроорганизмов. Поэтому мембраны *H. halobium* контрастно отличаются от других, известных науке мембран.

Пурпурные мембраны *H. halobium* обязаны своим цветом бактериородопсину, составляющему 50% (по другим данным еще больше) от общего содержания белков. Молекулы бактериородопсина, погруженные в гидрофобный мембранный матрикс, не рассеяны по мембране равномерно, а образуют гексагональную упаковку, повторяющиеся единицы которой состоят из трех молекул белка и около 40 молекул липида. 75% полипептидной цепи бактериородопсина закручено в α -спираль, образующую в пределах одной молекулы семь тяжей, около 45 Å длиной и ориентированных перпендикулярно к плоскости мембраны. 21 α -спиральный участок трех молекул родопсина в повторяющейся единице собран в виде двух концентрических колец: в большое кольцо входит 12 тяжей, в малое — 9. Наиболее вероятно, что центральную свободную

полость белковой триады заполняют липиды. Ретиналь бактериородопсина ориентирован перпендикулярно к белковым тяжам, т. е. параллельно плоскости мембраны.

По своему строению бактериородопсин ($M=26\,000$, одна субъединица) во многом похож на родопсин палочек сетчатки глаза (см. гл. VI). В молекуле этого хромопротеида белковый носитель соединен ковалентной Шиффовой связью с ретиналем — альдегидом витамина А, соединяющей альдегидную группу ретиналя (СНО) с аминогруппой (NH_2) аминокислоты лизина.

В бактериородопсине ретиналь находится в 13-*цис*-, в то время как в родопсине — в 11-*цис*-конформации. Длинноволновый максимум поглощения свободного ретиналя располагается при 380 нм, а бактериородопсина — при 570 нм. Такой сильный красный сдвиг поглощения возникает вследствие установления межмолекулярных взаимодействий между хромофорной группировкой и белком (подробнее об этом см. гл. VI).

После денатурационных нарушений конформации малополярными растворителями или детергентом спектр поглощения хромопротеида сдвигается от 570 к 370 нм.

По-видимому, бактериородопсин является единственным акцептором биологически активного света, поскольку спектр действия синтеза АТФ в бактериях качественно близок спектру поглощения этого пигмента.

Фотохимическая стадия фотосинтеза макроэргов, берущая начало от электронно-возбужденных состояний ретиналя, заключается в обратимом превращении бактериородопсина с максимумом поглощения при 570 нм (P_{570}) в хромопротеид с максимумом поглощения при 600 нм (P_{600}). При этом происходит фотоизомеризация ретиналя с превращением 13-*цис*-изомера в *транс*-форму, сопряженная, по-видимому, с конформационными изменениями белкового носителя — бактериоопсина. Согласно данным лазерной техники, первичная фотохимическая реакция завершается при комнатной температуре за время, меньшее 25 пс, причем квантовый выход этого превращения составляет при -190°C величину, близкую к 0,3. Обратная реакция $P_{600} \rightarrow P_{570}$ протекает с большей эффективностью. Данные, полученные с помощью флеш-фотолиза и техники низких температур, показали, что фотоиндуцированные превращения бактериородопсина

сопровождаются образованием ряда промежуточных продуктов, стабильных в определенных температурных интервалах. Таким путем создается замкнутый цикл превращений как со световой ($P_{600} \rightarrow P_{570}$), так и с темновой регенерацией исходного бактериородопсина. Следует отметить, что при физиологических условиях цикл завершается за несколько миллисекунд и на его заключительных стадиях (после P_{419}) регистрируются продукты P_{640} и P_{520} , не обнаруживаемые при низких температурах.

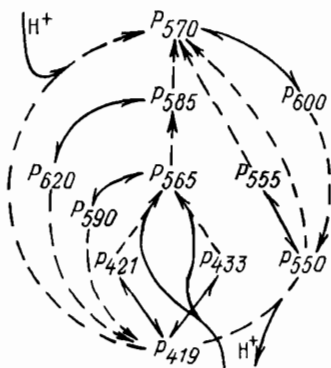
В ходе тщательного систематического исследования с фиксацией промежуточных продуктов при низкой температуре (-180°C) Ф. Ф. Литвин и С. П. Балашов обнаружили ряд дополнительных фотопродуктов: P_{585} , P_{565} , P_{421} , P_{590} , P_{620} и изучили их световые и темновые превращения (см. схему). Было установлено, что 1) три продукта P_{585} , P_{565} и P_{421} расположены на пути терминальной стадии темновой регенерации P_{570} и P_{419} ; 2) все интермедиаты способны к превращениям после поглощения второго кванта света; 3) первичные реакции бактериородопсина P_{570} , происходящие при температуре -180°C , генерируют продукты, спектр поглощения которых сдвинут в длинноволновую сторону; 4) фотопревращения продуктов темновых реакций (P_{550} , P_{419} , P_{565} и P_{585}) обязательно включают темновую стадию; 5) фотопревращение любого интермедиата совершается в направлении состояния, из которого он возник, т. е. каждый последующий квант обращает изменения, вызванные предыдущим; 6) темновые и световые реакции промежуточных продуктов не совпадают; 7) все световые реакции фотообратимы. По-видимому, обратимость превращений имеет определенное значение для обеспечения возможности многократного использования одних и тех же молекул бактериородопсина при генерации химической энергии.

Как сам бактериородопсин, так и промежуточные продукты его фотопревращения обладают способностью к флуоресценции при низкой температуре (-196°C). (У пурпурных мембран зарегистрированы максимумы флуоресценции при 595, 650, 700, 730 и 780 нм.) Спектры поглощения бактериородопсина и его фотопродуктов имеют сложную структуру, включающую несколько полос. Структурированность спектра наиболее выражена у коротковолновых продуктов P_{419} , P_{421} и P_{433} (полосы

при 376, 400, 421, 448 нм в спектре P_{421}) и наименее выражена у P_{570} (полосы при 540, 578 и 608 нм).

В 1973 г. Остерхельтом и Стокениусом показано, что освещение галобактерий приводит к выбросу ионов водорода из клетки в среду и созданию протонного трансмембранного потенциала. В присутствии ингибиторов фосфорилирования, препятствующих расходу протонов на синтез АТФ, величина светоиндуцированного электрохимического потенциала может достигать 150 мВ.

Позднее Остерхельт и Хесс обнаружили, что выброс протонов сопряжен со светоиндуцированным переходом $P_{570} \rightarrow P_{419}$, а их связывание мембраной — с обратным темновым переходом $P_{419} \rightarrow P_{570}$. За один цикл (см. схему)



происходит выделение одного протона в наружную среду и поглощение одного протона из внутриклеточного объема.

На инициацию этого процесса от электронно-возбужденных состояний бактериородопсина однозначно указывает и совпадение спектра фотоиндуцированного выброса протонов со спектром поглощения бактериородопсина. Прямое участие бактериородопсина в антитермодинамическом транспорте H^+ продемонстрировано также в лабораториях Рэкера и В. П. Скулачева на примере модельных систем: на искусственных фосфолипидных мембранах, замкнутых в микропузырьках, — липосомах, в состав которых вводился предварительно выделенный бактериородопсин. Поглощение света бактериородопсином липосом сопровождается поглощением протонов с обра-

зованием концентрационного градиента водородных ионов и трансмембранного электрохимического потенциала. Тот же результат был получен и на плоской фосфолипидной мембране с инкорпорированным в нее бактериородопсином. После включения света возникала разность потенциалов, которая прямо регистрировалась вольтметром от электродов, погруженных в раствор по обе стороны искусственной фосфолипидной мембраны.

О времени возникновения электрохимического потенциала можно судить по времени жизни самого долгоживущего интермедиата в цикле фотохимических превращений бактериородопсина. Оно составляет величину порядка 20—70 мс.

Возникает вопрос, откуда берутся протоны и как они транспортируются против электрохимического потенциала (снизу вверх в шкале энергий) сквозь плазматическую мембрану?

Наиболее вероятно, что источником протонов служит вода. Косвенным образом в пользу этого уже свидетельствуют приведенные выше опыты с искусственными фосфолипидными мембранами. Более конкретные доказательства получены в лаборатории Стокениуса, по данным которого бактериородопсин мембранных фрагментов галофильных бактерий с большой скоростью обменивает свой водород у Шиффова основания ретиналя на дейтерий тяжелой воды. Это указывает на важную роль Шиффовой связи ретиналя для транслокации протонов. Аргументом для такого заключения являются опыты, выполненные рядом авторов, согласно которым Шиффово основание ретиналя, протонированное в темноте, теряет свой протон под действием света.

В настоящее время трудно сказать, у какого промежуточного продукта бактериородопсина происходит резкое уменьшение сродства к протону. Ф. Ф. Литвин и С. П. Балашов указали на резкое увеличение способности Шиффова основания присоединять протон в результате реакции $P_{419} \rightarrow P_{421}$. Поэтому можно думать, что интермедиат P_{419} характеризуется низким сродством к H^+ .

Итак, протон внутриклеточной воды эффективно связывается Шиффовым основанием бактериородопсина. Каким же способом и по каким субстратам достигает

этот протон внешней поверхности мембраны? В. П. Скулачев предполагает, что протон передается поэтапно, эстафетно, через периодически расположенные кислотные группы — карбоксилы белка, фосфатные и сульфогруппы липидов бактериородопсинового комплекса, либо основные группы — аминогруппы белка или липида. Нужное расположение всех групп поддерживают жесткие α -спиральные белковые тяжи, причем тяжи большого кольца несут один тип протон-проводящего пути (например, кислотные группы), а малого — другой (основные группы). Переход протона от протонированной группы донора к соседнему депротонированному акцептору (от RH^+ к RO^-) осуществляется при их столкновении в результате конфигурационно-конформационных движений при структурных перестройках бактериородопсинового комплекса, например, при *цис-транс*-изомеризации ретиналя. По такому механизму протон может успешно преодолеть всю длину проводящего пути от внутренней к внешней поверхности мембраны (около $50 \text{ \AA}$). Предполагается, что движущей силой переноса протона против электрохимического градиента является напряженная конформация бактериородопсинового комплекса, создающаяся в ходе фотохимической реакции *цис-транс*-изомеризации и конформационной модификации бактериородопсина.

Вполне возможно, что некоторые из дискретных этапов переноса протона (например, от воды к Шиффову основанию ретиналя) требуют самостоятельных энергетических «подкормок» со стороны фотохимических актов. Иными словами, одна фотохимическая реакция, вероятно, не в состоянии перебросить протон через мембрану. В этой связи представляют интерес опыты Стокениуса, в результате которых установлено, что для обмена водорода бактериородопсинового комплекса на ион дейтерия тяжелой воды требуется не менее чем четыре коротких импульса света.

Итак, *фотохимические процессы, протекающие в бактериородопсине, сопряжены с запасанием энергии квантов света в трансмембранном электрохимическом градиенте ионов водорода, как промежуточном энергетическом «резервуаре» на пути синтеза микробной клеткой АТФ.*

Зная величину квантового выхода первичной фотореакции, нетрудно определить эффективность запасаения энергии света галобактериями. Если принять, что энергия квантов света, поглощаемых бактериородопсином, равна примерно 2,2 эВ, а перенос одного протона связан с запасанием 0,3 эВ, то энергетический выход процесса оказывается равным 0,04, что значительно ниже величины 0,43 — к. п. д. превращения свет → промежуточные продукты при фотосинтезе у зеленых растений (гл. IV).

Светоиндуцируемый синтез АТФ у голодающих (без питания) галофильных бактерий в анаэробных условиях был впервые обнаружен Стокениусом и Даноном.

Согласно недавно полученным данным Райнера и Остерхельта, скорость фотофосфорилирования линейно зависит от содержания бактериородопсина в клетке и интенсивности света (в интервале $E = 1-200 \text{ Вт/м}^2$). При более высоких интенсивностях света ($E > 250 \text{ Вт/м}^2$) наблюдается насыщение фотофосфорилирования. Для синтеза одной молекулы АТФ необходимо поглощение бактериородопсином около 22 квантов света.

Образование АТФ подавляется ингибиторами мембранной АТФ-азы и разобщителями окисления и фосфорилирования, которые, согласно современным представлениям, делают энергосопрягающую мембрану полностью проницаемой для H^+ . В последнем случае бактерии утрачивают также способность подкислять на свету окружающую среду. В противоположность этому различные ингибиторы электронно-транспортной цепи (переносчиков электронов) не блокируют бактериородопсиновый фотосинтез АТФ.

Чрезвычайно важное значение для понимания природы превращения $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ в АТФ имеют опыты Рекера и Стокениуса, в которых показано, что фосфолипидные липосомы, содержащие АТФ-азу (АТФ-синтазу) из митохондрий сердца быка и бактериородопсин, способны создавать не только $\Delta\mu_{\text{H}^+}$, но и синтезировать на свету АТФ из АДФ и минерального фосфата.

Иными словами, для фотосинтеза АТФ необходимо и достаточно три компонента: малопроницаемый для протонов липидный слой, бактериородопсиновый комплекс и АТФ-аза. Следовательно, бактериородопсиновый синтез

АТФ не нуждается «в услугах» дыхательной цепи, хотя она и локализована в той же плазматической мембране, но причинно связан с электрохимическим градиентом водородных ионов и низкой проницаемостью для них мембранных структур. Синтез АТФ осуществляется ферментативно, с помощью мембранной протонной АТФ-азы (АТФ-синтетаза), по-видимому, за счет энергии электрохимического потенциала. Это означает, в свою очередь, что генерация АТФ осуществляется в соответствии со схемой Митчела. Согласно некоторым данным, при $pH < 6,5$ основной вклад в фосфорилирование вносит градиент водородных ионов, а при $pH > 6,5$ — мембранный потенциал.

Не исключено, однако, что трансформация энергии электрохимического градиента в химическую энергию макроэргических связей АТФ происходит через стадию напряженной конформации АТФ-синтетазы или содержащих ее мембранных доменов.

Таким образом, представляется вероятной определенная последовательность смены форм энергии в ходе бактериородопсинового фотосинтеза макроэргов: световая → электронно-колебательная возбужденного состояния бактериородопсина → механическая (конформационная) бактериородопсинового комплекса → осмотически-электрическая (электрохимический потенциал) → химическая (макроэргические связи АТФ).

Фотосинтетический аппарат галобактерий и его активность находятся в тонких регуляторно-адаптационных взаимоотношениях со средой и состоянием клетки.

Так, дефицит органических питательных веществ и свет включают аппарат биосинтеза бактериородопсина, приводящий к формированию пурпурных мембран и их фотосинтетического аппарата. С другой стороны, свет ингибирует процессы дыхания, связанные с окислением органических молекул, работой цепи переносчиков электронов и окислительным фосфорилированием. Спектр действия этого процесса совпадает со спектром поглощения бактериородопсина. Наряду с фотоингибированием дыхания в кислых средах и при больших интенсивностях света отмечается обратный эффект — фотостимуляция дыхания (Ф. Ф. Литвин с сотр.), инициируемый, судя по спектрам действия, также бактериородопсином.

Бактериородопсиновый фотосинтез макроэргов у галофильных бактерий принципиально отличается от фотосинтеза у других растительных и микробных организмов по месту локализации аппарата и его устройству (плазматические мембраны вместо мембран хлоропластов), природе светопоглощающих хромофоров (бактериородопсин вместо хлорофилла), первичной фотохимической реакции (изомеризация ретиналя вместо окислительно-восстановительных превращений пигмента), темновой утилизации световой энергии (транспорт протона вместо транспорта электронов) и эффективности трансформации световой энергии в химическую.

Рекомендуемая литература

Литвин Ф. Ф., Балашов С. П. Новые интермедиаты в фотохимических превращениях бактериородопсина.— Биофизика, 1977, 22, 1111.

Литвин Ф. Ф., Балашов С. П., Синешев В. А. Исследование первичных фотохимических превращений бактериородопсина в пурпурных мембранах и клетках *Halobacterium halobium* методом низкотемпературной спектrophотометрии.— Биоорганическая химия, 1975, 1, 1767.

Daipon A., Caplan S. Stimulation of ATP synthesis in *Halobacterium halobium* R by light-induced or artificially created proton electrochemical potential gradients across the cell membrane.— Biochim. et biophys. acta, 1976, 423, 133.

Osterheft D., Stoekenius W. Functions of a new photoreceptor membrane.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, 70, 2853.

Stoekenius W., Lozier R. Light energy conversion in *Halobacterium halobium*.— J. Supramolec. Struct., 1974, 2, 769.

Глава VI. ЗРЕНИЕ

По своей биологической значимости фоторецепция (зрение) по праву может быть отнесена ко второму после фотосинтеза фотобиологическому процессу. Фотобиологические процессы, лежащие в основе зрения, относятся к информационным физиологическим реакциям. Действительно, зрение позволяет животным дистанционным путем получать информацию об окружающем мире и правильно ориентироваться во внешней среде, в частности корректировать свое поведение и передвижение в зависимости от условий окружения. Еще большее значение зрение имеет для человека, обладающего второй сиг-

нальной системой. Принято считать, что около 90% всех знаний человек получает через зрительный анализатор.

Аппарат и механизм зрения выработались и совершенствовались в ходе эволюционного развития, пройдя сложный путь от светочувствительных пятен у простейших до сложно дифференцированного глаза у позвоночных.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФОТОРЕЦЕПЦИИ

Молекулярными ловушками световой энергии являются специализированные зрительные пигменты, прежде всего родопсин, от электронно-возбужденных состояний которых триггируется сложная цепь событий, приводящая к возникновению зрительного сигнала. В наиболее общем виде итоговая реакция фоторецепции может быть представлена такой схемой: зрительный пигмент + свет → нервный импульс.

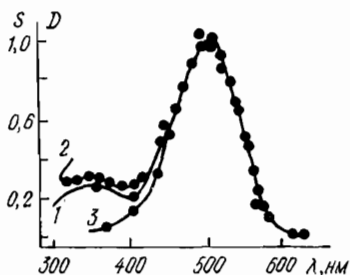


Рис. 24. Спектр действия скотопического (палочкового) зрения (1), спектр поглощения родопсина (2), фоточувствительность (S) глаза, лишённого хрусталика (3) (Blum H., 1950)

Энергетические уровни зрительных пигментов располагаются так, что создаются оптимальные условия для поглощения квантов естественного света. В то же время эти пигменты включены в состав липопротеидных мембран фоточувствительных клеток, например, палочек и колбочек позвоночных, что, в свою очередь, создает условия для высокоэффективной трансформации энергии света в энергию нервного импульса. По вполне понятным причинам спектры действия зрительной рецепции совпадают со спектрами поглощения пигментов (рис. 24).

Фоточувствительные клетки снабжены эффективным аппаратом темнового усиления сигнала. При этом коэффициент усиления по мощности достигает величин порядка $10^5 \div 10^6$. В результате даже одного-единственно-

го кванта света оказывается достаточно для генерации нервного импульса, например, у *Limulus* или *Xiphosura polyphenus*. Адаптированный к темноте глаз человека в состоянии регистрировать попадание трех квантов света.

Таким образом, зрительный рецептор несет в себе черты выраженного триггерного устройства. Квант света через родопсин инициирует мощные ионные потоки через мембрану, лежащие в основе генерации нервного импульса. В конечном счете ничтожная сама по себе энергия, заключенная в кванте света, сильно уменьшает свободную энергию системы, вызывая ионную деполяризацию мембраны нервной клетки. Грубо говоря, имеет место событие, напоминающее разрядку конденсатора. Естественно, что на поляризацию мембраны ранее была затрачена энергия макроэргических соединений. Иными словами, с энергетической точки зрения фоторецепция может рассматриваться как *сверхэндергонический процесс*. В противоположность фотосинтезу в зрительных реакциях энергия света не запасается, а, наоборот, происходят значительные потери имевшихся в рецепторном аппарате запасов свободной энергии. Зрение представляет собой сложный многостадийный процесс, включающий фотофизические, фотохимические, конформационные, ионно-транспортные, электрофизиологические стадии.

Строение фоторецепторного аппарата рассмотрим на примере органа зрения млекопитающих животных.

Глаз животных имеет сложную организацию. По функциональному признаку можно выделить две основные части глаза: оптическое устройство, ответственное за фокусировку изображения внешних предметов (зрачок, хрусталик и стекловидное тело), и воспринимающий свет аппарат (сетчатка). Сетчатка глаза вместе с черной пленкой пигментного слоя за ней образует дно глазного бокала. Сетчатка глаза представляет собой розовый слой толщиной 200—300 мкм, включающий рецепторные, нервные и глиальные клетки. Известно два типа фоторецепторных клеток — палочки и колбочки, получившие названия благодаря своей форме. В сетчатке глаза палочки и колбочки распределены неравномерно. В центральной области (ямке) сконцентрированы только колбочки, а по периферии сетчатки — преимущественно палочки.

Размеры зрительных клеток у различных представителей животного мира сильно варьируют. Так, диаметр палочки лягушки, по данным Уолкена, составляет 6, дли-

на — 50 мкм, объем $1,4 \cdot 10^{-12}$ мкм³, а палочки быка — 1,10 мкм и $7,5 \cdot 10^{-17}$ мкм³ соответственно. Зрительные клетки обоих типов имеют сходное строение.

Палочка состоит из внутреннего и наружного сегментов, связанных между собой тонкой соединительной ножкой, или ресничкой (рис. 25). Внутренний сегмент, включающий внутриклеточные органеллы (митохондрии, рибосомы и др.), переходит в ядерно-плазматическое тело, базальная часть которого снабжена пресинаптическим окончанием, вступающим в контакт с биполярными клетками. Ножка играет важную роль в транспорте метаболитов (белки, АТФ и т. д.), которые нужны для обнов-

ления и функционирования наружного сегмента. В частности, через ножку в наружный сегмент переносится родопсин, синтезируемый рибосомами внутреннего сегмента. Наружный сегмент выполняет фоторецепторную функцию клетки. Он заполнен стопкой дисков, ориентированных перпендикулярно к длинной оси клетки. В наружных сегментах палочек позвоночных содержится около 1000—2000 дисков.

Диск представляет собой двойную мембрану с замкнутым внутренним пространством. Диски как бы плавают в цитоплазме наружного сегмента и, по-видимому, не связаны с наружной

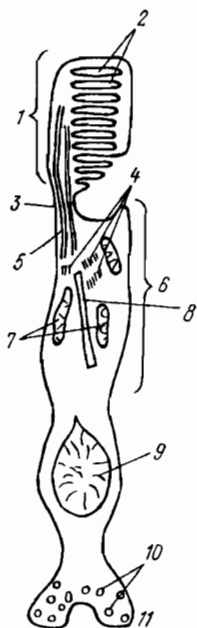


Рис. 25. Строение зрительной клетки палочки:

1 — наружный сегмент; 2 — диски; 3 — соединительная ножка; 4 — центриоли; 5 — фибриллы-реснички; 6 — внутренний сегмент; 7 — митохондрии; 8 — корешок реснички; 9 — ядро; 10 — везикулы; 11 — пресинаптическое окончание

мембраной палочки. По данным рентгеноструктурного анализа, диски характеризуются следующими параметрами: толщина диска 150 Å, толщина междискового пространства 160, толщина мембраны 65 и ширина внутридискового пространства 5 Å.

В мембранном материале наружных сегментов весо-

вое отношение между мембранами дисков и наружной мембраной составляет 100:1. При этом в мембранах дисков содержится 50% липидов, 40 — белков, 4 — углеводов и 6% воды. Из всех липидов примерно 85% приходится на фосфолипиды, 6 — на нейтральные липиды и только 1—3% на холестерин. Представление о фосфолипидном составе мембран наружных сегментов палочек дает табл. 6.

Таблица 6. Фосфолипидный состав мембран наружных сегментов палочек (%)

Животное	Фосфатидилхолин	Фосфатидилэтаноламин	Фосфатидилсерин	Фосфатидилинозит	Сфингомиелин
Бык	41	39	12,9	2,3	3,6
Лягушка	45	34,6	12,8	2,2	1,9
Крыса	41	36,6	12,6	2,2	2,6

Фосфолипиды мембран наружных сегментов содержат большое количество полиненасыщенных жирных кислот. По данным Андерсона с сотр., жирные кислоты в фосфолипидах представлены ненасыщенной доказановой (22:6) и насыщенными пальмитиновой (16:0) и стеариновой (18:6) кислотами. При этом фосфатидилхолин содержит 23%, фосфатидилэтаноламин — 39 и фосфатидилсерин — 45% доказановой кислоты.

Зрительный пигмент — родопсин — является хромопротеидом. По данным различных авторов, в наружных сегментах палочек 80—90% от всего мембранного белка составляет родопсин.

Ультраструктурная организация мембран дисков рассматривается в настоящее время в рамках мозаичной модели Зингера — Никольсона. Действительно, липиды дисков организованы в виде бислоя. На это указывают данные, полученные методом двойного лучепреломления и рентгеноструктурного анализа. Различные фосфолипиды распределены асимметрично по обе стороны бислоя. Так, фосфатидилэтаноламин преимущественно локализован на внешней, а фосфатидилсерин и фосфатидилхолин — на внутренней стороне мембраны диска.

К сожалению, однозначного мнения о характере про-

странственного расположения родопсина в мембране в литературе нет. Существует несколько моделей, описывающих локализацию хромопротеида в липидном бислое диска. Обсуждаются различные стереометрические формы родопсина (шар, эллипсоид, гантель), локализованные симметрично (по обе стороны мембраны), асимметрично (только на одной стороне) либо трансмембранно (пронизывают липидный бислой насквозь).

Принимая во внимание высокое содержание в липидах мембран дисков ненасыщенных жирных кислот, можно ожидать, что липидная фаза мембраны при физиологических условиях находится в жидком состоянии и молекулы родопсина обладают определенной степенью подвижности. Подтвердил это положение интересный эксперимент, проведенный Брауном. Сетчатка, предварительно обработанная глютаровым альдегидом, связывающим белковые молекулы поперечными сшивками, практически устраняющими движение компонентов мембраны относительно друг друга, облучалась поляризованным светом с вектором, параллельным оси палочек. В противоположность интактиной сетчатке ее «фиксированные» препараты обнаруживали сильное увеличение дихроизма по мере выцветания родопсина. В таких условиях свет вызывал обесцвечивание преимущественно тех молекул родопсина, осцилляторы поглощения которых ориентированы параллельно вектору поляризованного света, что и привело к усилению дихроизма. В интактной мембране селективное обесцвечивание было выражено слабо вследствие вращательных движений родопсина в липидной фазе.

Используя импульсное освещение плоскополяризованным светом, Кон по кинетическим кривым проявления дихроизма рассчитал время релаксации родопсина в мембране, которое оказалось равным 20 мкс. Приняв молекулу родопсина за сферу с радиусом $25 \text{ \AA}$, он оценил также эффективную вязкость липидной фазы мембраны в $0,5\text{--}2 \text{ Па} \cdot \text{с}$ (вязкость оливкового масла).

Кроме вращательных движений родопсин способен и к трансляционным перемещениям в плоскости мембраны — латеральной диффузии, что недавно установлено методом микроспектрофлуориметрии. Рассчитанная на

основании этих опытов вязкость липидной фазы мембран дисков также составила величину порядка 2 Па·с. Количественная оценка участия родопсина в процессах латеральной диффузии в мембране была проведена Агроскиным с сотр. По данным этих авторов, часть родопсинового пула (около 20%) или неподвижна, или перемещается в мембране очень медленно.

2. ЗРИТЕЛЬНЫЕ ПИГМЕНТЫ

Все зрительные пигменты представляют собой липохромопротеиды — комплексы глобулярного белка опсина, липида и хромофора ретиналя. Различают два типа ретиналя: ретиналь I (окисленная форма витамина A₁) и ретиналь II (окисленная форма витамина A₂). В отличие от ретиналя I ретиналь II имеет необычную двойную связь в α-иононовом кольце между третьим и четвертым атомами углерода. Общее представление о зрительных пигментах дает табл. 7.

Таблица 7. Типы зрительных пигментов

Пигмент	Максимум поглощения, нм	Хромофор	Белок	Где встречается
Родопсин	498	Ретиналь I	Опсин палочек	У позвоночных
Иодопсин	445	» II	» колбочек	У млекопитающих, птиц, черепах
»	535	» I	» »	Там же
»	570	» I	» »	» »
Порфиросин	522	» II	» палочек	У пресноводных рыб
Цианопсин	620	» II	» колбочек	У черепах и некоторых рыб

Рассмотрим теперь более подробно строение и свойства родопсина. Единодушного мнения о величине молекулярной массы белковой части родопсина до сих пор нет. Так, например, для родопсина быка в литературе

приводятся цифры от 28 000 до 41 000, лягушки от 26 600 до 35 600, кальмара от 40 000 до 70 000, что может быть связано не только с методическими особенностями определения молекулярных весов различными авторами, но также и субъединичным строением родопсина, различной представленностью мономерных и димерных форм.

Спектр поглощения родопсина характеризуется четырьмя максимумами: в α -полосе (500 нм), β -полосе (350 нм), γ -полосе (278 нм) и δ -полосе (231 нм). Считается, что α - и β -полосы в спектре обусловлены поглощением ретиналя, а γ - и δ -полосы — поглощением опсина. Молярные экстинкции имеют следующие значения: при 500 нм — 43 250, при 350 нм — 10 600 и при 278 нм — 71 300.

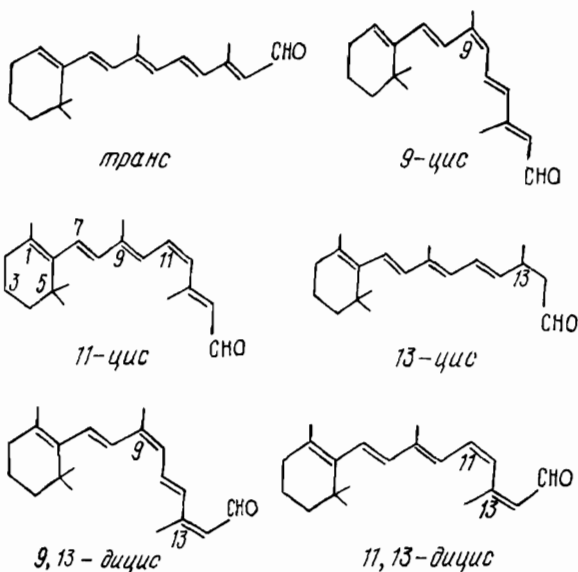
Для оценки чистоты препарата родопсина обычно используют спектроскопические критерии — отношение оптических плотностей для видимой (хромофорной) (D_{400}/D_{500}) и ультрафиолетовой (белокхромофорной) области (D_{278}/D_{500}). Для наиболее очищенных препаратов родопсина эти значения соответственно равны 1,6—1,75 и 0,168. Родопсин флуоресцирует в видимой области спектра с максимумом свечения при 580 нм в дигитониновом экстракте и при 600 нм — в составе наружных сегментов. Квантовый выход его флуоресценции около 0,005.

Белковая часть зрительного пигмента (опсин) быка, крысы и лягушки имеет близкий аминокислотный состав с равным содержанием неполярных (гидрофобных) и полярных (гидрофильных) аминокислотных остатков. К аспарагиновому остатку опсина присоединена одна олигосахаридная цепь, т. е. опсин представляет собой гликопротеид. Предполагается, что полисахаридная цепь на поверхности родопсина играет роль «фиксатора», ответственного за ориентацию белка в мембране диска. По данным ряда авторов, опсин не несет N- и C-концевых аминокислотных остатков, т. е. полипептидная цепь белка, по-видимому, циклизована. Аминокислотный состав опсина еще не определен. Изучение дисперсии оптического вращения препаратов опсина показало, что содержание α -спиральных участков в опсине 50—60%.

В нейтральной среде молекула опсина несет отрицательный заряд и обладает изоэлектрической точкой при $pH=5,3$.

Менее ясен вопрос о том, сколько молекул фосфолипидов связано с одной молекулой опсина. Согласно данным различных авторов, эта цифра сильно варьирует. По мнению Абрахамсона, в каждом липохромопротеиде с опсином прочно связано восемь молекул фосфолипидов (из них пять молекул фосфатидилэтаноламина). Кроме того, в комплекс входят 23 слабосвязанные молекулы фосфолипидов.

Рассмотрим теперь основной хромофор зрительного пигмента — 11-цис-ретиаль. На каждую молекулу белка в родопсине приходится лишь одна молекула пигмента. 11-цис-ретиаль содержит в боковой цепи четыре сопряженные двойные связи, которые обуславливают *цис-транс*-изомерию молекулы пигмента. От всех известных стереоизомеров 11-цис-ретиаль отличается выраженной нестабильностью, что связано с уменьшением энергии резонанса, обусловленным нарушением компланарности боковой цепи.



Концевая альдегидная группа в боковой цепи обладает повышенной реакционной способностью и реагиру-

ет с аминокислотами, их аминами и фосфолипидами, содержащими аминогруппы, например, фосфатидилэтанол-амином. При этом образуется альдиминная ковалентная связь — соединение типа Шиффова основания ($\text{HC}=\text{N}-$).

Спектр поглощения 11-*цис*-ретиная обнаруживает максимум при 380 нм. Как уже упоминалось, тот же хромофор в составе зрительного пигмента имеет максимум поглощения при 500 нм. Такой большой батохромный сдвиг (около 120 нм) может быть обусловлен рядом причин: протонированием азота в альдиминной группе, взаимодействием ретиная с SH-группами опсина, слабыми межмолекулярными взаимодействиями ретиная с белком. Ирвинг считает, что основной причиной сильного батохромного сдвига в спектре поглощения ретиная является высокая локальная поляризуемость среды вокруг хромофора. Такой вывод им был сделан на основании модельных опытов, в которых измерялись спектры поглощения протонированного производного ретиная с аминосоединением в различных растворителях. Оказалось, что в растворителях с более высоким показателем преломления отмечался и более сильный батохромный сдвиг.

На решающую роль взаимодействий белка с ретином в определении положения длинноволнового максимума поглощения зрительного пигмента указывают также опыты Рэдинга и Уолда, в которых зарегистрировано обесцвечивание пигмента при протеолизе белкового носителя. С различиями во взаимодействиях ретиная с микроокружением в пределах липопротеидного комплекса могут быть связаны наблюдающиеся довольно широкие вариации в положении максимумов спектров поглощения зрительных пигментов (от 430 до 575 нм) у различных видов животных.

Еще несколько лет назад сильные споры среди фотобиологов вызывал вопрос о природе партнера, с которым соединен ретиналь в зрительном пигменте. В настоящее время общепринята точка зрения о том, что ретиналь с помощью Шиффова основания связан с белком — опсином. При этом ковалентная связь замыкается между альдегидной группой ретиная и ϵ -аминогруппой лизина белка.

3. ФОТОФИЗИКА И ФОТОХИМИЯ ЗРИТЕЛЬНОЙ РЕЦЕПЦИИ

В основе механизмов зрения лежит первичная фотохимическая реакция *цис-транс-изомеризации ретиналя*— «распрямление» сопряженной углеводородной цепи хромофора. *Цис-транс-изомеризация ретиналя протекает по одноквантовому (одноударному) механизму.* Фотофизические процессы в ретинале, предшествующие фотохимической реакции, изучались многими авторами. Поглощение света ретиналем обусловлено скорее всего $\pi \rightarrow \pi^*$ -, а не $n \rightarrow \pi^*$ -переходом. Так, было показано, что константы скорости образования водородной связи альдегидной группы ретиналя с кислородом не различаются в основном и возбужденном состоянии (данные флеш-фотолиза). Иными словами, распределение электронной плотности у атома кислорода в основном и возбужденном состоянии одинаково, чего не было бы при передаче несвязывающего n -электрона кислорода на делокализованную π -орбиту. Об этом свидетельствуют также высокие значения коэффициента экстинкции 11-*цис*-ретиналя (около 10^4), что характерно для $\pi \rightarrow \pi$ -поглощения.

В противоположность фотосинтезу фотофизическая стадия зрительной рецепции не включает процессов межпигментной миграции энергии, т. е. поглощенная ретиналем энергия не делокализуется в пределах палочки. Это следует из проявления дихроизма родопсина палочек в режиме интенсивного фотовыцветания при облучении поляризованным светом и высоких значений степени поляризации флуоресценции замороженных спиртовых растворов родственного ретиналю витамина A_1 . Однако в пределах одной макромолекулы липохромопротеида имеет место миграция энергии от опсина к ретиналю с изомеризацией последнего. Квантовый выход изомеризации для $\lambda = 280$ нм составляет всего 0,26 (для видимой области спектра 0,66). Это указывает на низкую эффективность миграции энергии между ароматическими аминокислотами опсина и ретиналем, которая, по данным Эбрей, не превышает 12%.

Таким образом, *все фотофизические и фотохимические события, лежащие в основе механизмов зрения, строго локализованы в месте поглощения кванта света.*

Высказывается предположение, что первичная фото-

химическая реакция зрения (*цис-транс*-изомеризация ретиналя) протекает через триплетное состояние $^3(\pi-\pi^*)$ хромофора. Основанием для этого вывода служат квантовомеханические расчеты, показывающие, что в триплетном состоянии резко уменьшается энергетический барьер, разделяющий *цис*- и *транс*-формы как ряда органических молекул, так и самого ретиналя. В пользу протекания *цис-транс*-изомеризации ретиналя через триплетное состояние свидетельствуют также и некоторые экспериментальные данные. В частности, обнаружена заселенность триплетных уровней ретиналя при его освещении. В опытах с использованием флеш-фотолиза было зарегистрировано триплет-триплетное поглощение ретиналя, которое не могло иметь места при низкой концентрации молекул в первом триплетном состоянии. Тот же вывод следует из анализа процессов миграции энергии донор $\rightarrow$ триплетное состояние ретиналя.

С помощью флеш-фотолиза показано также, что вероятность синглет-триплетной интеркомбинационной конверсии ретиналя составляет 60% от общей вероятности дезактивации синглетного возбужденного состояния. Это удовлетворительно согласуется с величиной квантового выхода фотоизомеризации ретиналя (0,6—0,7) как в свободном состоянии, так и в составе родопсина. Однако предположению о триплетной природе реакции фотоизомеризации ретиналя противоречат данные, полученные в лаборатории Ламолы: с помощью пикосекундной спектроскопии удалось оценить время *цис-транс*-превращения ретиналя (около 6 пс), которое оказалось слишком коротким по сравнению со временем жизни триплетных состояний.

Остановимся более подробно на квантовых выходах фотоизомеризации ретиналя. Квантовый выход превращения 11-*цис* $\rightarrow$ полностью *транс*-форма свободного ретиналя в гексановых растворах, по данным Уолда, сильно зависит от температуры. При температуре 25° С квантовый выход (при $\lambda=365$ нм) равен 0,2, в то время как при —65° С — 0,6. Последняя величина совпадает с усредненным для трех длин волн видимого света (450, 500, 550 нм) значением квантового выхода изомеризации хромофора родопсина в дигитониновом растворе при 20° С. Это совпадение скорее всего означает, что свойства микроокру-

жения хромофора, входящего в состав родопсина, и замороженной гексановой матрицы сходны. Еще более высокое значение квантового выхода обесцвечивания различных зрительных пигментов получены Дартнеллем и Кропфом — 0,67. Наконец, по данным Рипса и Уила, квантовый выход фотолиза родопсина в живом глазу человека близок к единице. Приведенные данные позволяют сделать вывод о том, что реальные значения квантового выхода *цис-транс*-фотоизомеризации ретиналя в родопсине чрезвычайно высоки и приближаются к единице.

Интересные данные о фотолизе родопсина в дигитониновых экстрактах получены М. А. Островским с сотр. Оказалось, что квантовый выход реакции имел высокие значения (близкие к единице) и практически не зависел от температуры в интервале $20 \div 5^\circ\text{C}$. Уменьшение температуры ниже -10°C сопровождалось резким (приблизительно в

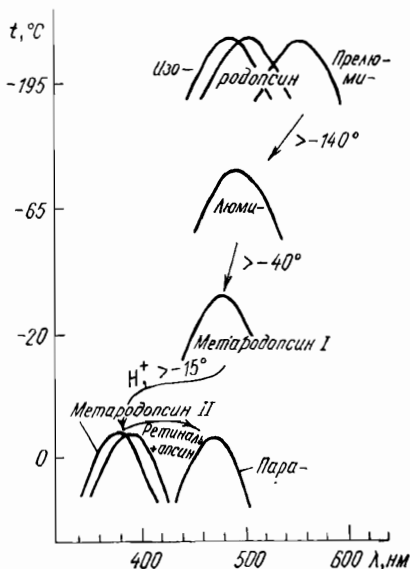
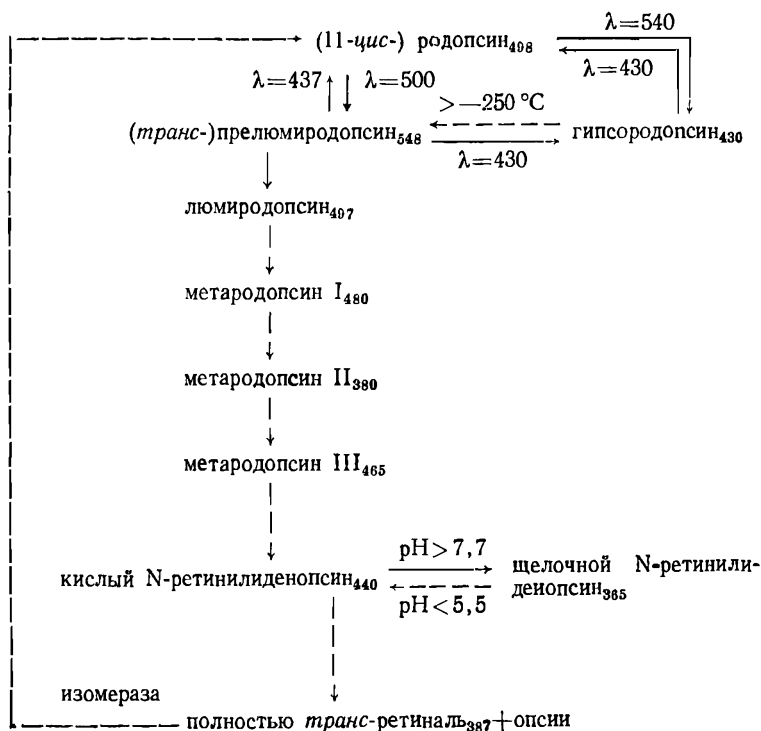


Рис. 26. Спектральные изменения, сопутствующие фотолизу родопсина (Wald G., Brown P., 1958)

Освещение проводилось при $t = -196^\circ\text{C}$, затем образец постепенно нагревался в темноте

100 раз) падением квантового выхода. Для интервала $-10 \div 30^\circ\text{C}$ квантовый выход также не зависел от температуры. Такая аномальная температурная зависимость указывает на важную роль структурного состояния околохромофорного окружения в определении эффективности фотохимической реакции. Скачкообразный характер падения квантового выхода может быть обусловлен кооперативной структурной перестройкой, например, в липидной фазе мембраны.

Итак, фотохимическая дезактивация возбужденной молекулы ретиналя, заключающаяся в ее *цис-транс*-изомеризации, переходе 11-*цис*- → полностью *транс*-изомеры, осуществляется, по-видимому, через триплетное состояние. Между первичной фотохимической реакцией и гидролизом родопсина с образованием свободного ретиналя протекает ряд промежуточных темновых реакций. Эти реакции детально изучены в экспериментах с использованием импульсной спектрофотометрии и стабилизации промежуточных продуктов в определенных температурных интервалах (рис. 26). Тем не менее вопрос о количестве и последовательности образования промежуточных продуктов еще далек от окончательного разрешения. Ниже приводится одна из наиболее общепринятых схем превращения родопсина — модифицированная схема Уолда:



Первый продукт, возникающий из родопсина,— прелюмиродопсин. По сравнению с родопсином прелюмиродопсин обладает более длинноволновой полосой поглощения и более высокими значениями молярной экстинкции (максимум спектра поглощения при 548 нм, $\epsilon = 72\,000$). Прелюмиродопсин стабилен при температуре -195°C . Реакция родопсин $\rightarrow$ прелюмиродопсин очень быстрая и фотообратимая.

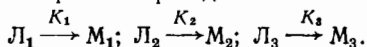
Обнаружен также альтернативный продукт гипсородопсин, возникающий из родопсина при температуре жидкого гелия в ходе облучения светом с длиной волны больше чем 540 нм. Этот продукт превращается в прелюмиродопсин или термально (выше -250°C), или фотохимически при облучении светом с $\lambda = 430$ нм.

До последнего времени считалось, что именно на стадии родопсин $\rightarrow$ прелюмиродопсин и происходит изомеризация ретиналя из 11-*цис*- в полностью *транс*-форму. Однако результаты прямых измерений продолжительности этой реакции (6 пс) и кинетики процесса поставили под сомнение это уже установившееся положение, поскольку столь высокие скорости несвойственны реакции *цис-транс*-изомеризации. Предполагается, что на данной стадии за счет вступления метильного Н-атома при C₁₈ в водородную связь с азотом близлежащего имидазольного кольца и перевода азота Шиффовой связи в состав энеаминной NH-группы происходит нарушение планарности структуры ретиналя с образованием термодинамически неустойчивой структуры. Согласно другой точке зрения, причиной образования структуры, предрасположенной к трансформации, является разделение зарядов — перенос электрона от белка к ретиналю с образованием анион-радикала. Образование же *транс*-формы ретиналя происходит на последующих стадиях процесса, которые протекают в темноте и контролируются температурой. В ходе последовательных превращений спектры поглощения и люминесценции продуктов постепенно сдвигаются в коротковолновую сторону. Эти сдвиги обусловлены не химической модификацией ретиналя, а структурными перестройками в липохромопротеиде.

При увеличении температуры свыше -140°C прелюмиродопсин спонтанно превращается в люмиродопсин, имеющий максимум поглощения при 497, а флуоресценции — при 600 нм. Время полупревраще-

ния этой реакции составляет $3 \cdot 10^{-8}$ с. Реакция характеризуется следующими активационными параметрами: $\Delta H^* = 6,0$ ккал/моль и $\Delta S^* = 15$ кал/моль·град. Дальнейшее нагревание до -40°C сопровождается образованием метародопсина I (максимум спектра поглощения при 480, флуоресценции — 580 нм). При комнатной температуре метародопсин образуется примерно за 10^{-3} с.

Кинетика превращения люмиродопсин $\rightarrow$ метародопсин I описывается на начальных стадиях уравнением реакции второго, а на конечных — первого порядка. Это позволило Абрахамсону рассмотреть данную реакцию как энзиматический процесс, протекающий через образование опсин-субстратного комплекса: $L + E \rightarrow LE \rightarrow M$, где образование LE — бимолекулярная, а его распад — мономолекулярная реакция. При этом Абрахамсон предполагает, что люмиродопсин гетерогенен и состоит из трех форм: L_1 , L_2 и L_3 . Каждая из форм люмиродопсина превращается в свою форму метародопсина I с различными константами скоростей перехода:



Процесс характеризуется высокими значениями энтропии ($\Delta S^* = 70$ кал/моль·град) и энтальпии ($\Delta H^* = 25$ ккал/моль) активации.

Следующий продукт — метародопсин II — возникает из метародопсина I при температуре, превышающей -15°C (максимум спектра поглощения при 380, флуоресценции — 535 нм). На этой стадии происходят наиболее существенные изменения конформации зрительного пигмента, о чем свидетельствуют следующие факты: 1) значительный батохромный сдвиг (почти 100 нм); 2) возникновение чувствительности к борогидриду натрия, атакующему альдиминную связь, что указывает на переход альдиминной группировки из гидрофобной в гидрофильную область; 3) экспонирование двух-трех сульфгидрильных групп в молекуле опсина; 4) высокие значения энтальпии ($\Delta H^* = 30,7$ ккал/моль) и энтропии ($\Delta S^* = 55$ кал/моль·град) активации, приближающиеся к термодинамическим параметрам денатурации белков.

Показано также, что эффективность превращения метародопсин I $\rightarrow$ метародопсин II зависит от белок-липидных взаимодействий. Так, в озвученной суспензии мембран дисков быка процесс протекает при 39°C по кинетике реакции первого порядка с $\tau_{1/2} = 0,4$ мс, а в дигитониновых экстрактах — по сложной кинетике, которую можно представить как наложение нескольких процессов, описываемых кинетикой реакций первого порядка. Наиболее быстрый компонент имеет $\tau_{1/2} = 27$ мкс.

Все стадии от образования прелюмиродопсина до возникновения метародопсина II легко обратимы в темноте: обратные реакции инициируются понижением температуры.

Кроме метародопсина II в результате темнового превращения зрительного пигмента образуются метародопсин III, или парародопсин/ (максимум спектра поглощения при 465 нм), две формы N-ретинилиденопсина с максимумами спектров поглощения при 365 и 440 нм соответственно, *опсин* и свободный *полностью транс-ретиноаль*. Эти финальные стадии превращения родопсина еще недостаточно изучены. Показано только, что в молекуле хромопротеида на стадии превращения метародопсина I в метародопсин II экспонируется еще одна сульфгидрильная группа, а на стадии метародопсин III $\rightarrow$ N-ретинилиденопсин происходит экспонирование Шиффовой связи. До сих пор дискутируется вопрос о том, можно ли включать метародопсин III и N-ретинилиденопсин₃₆₅ в общую цепь превращений или они являются лишь ее ответвлениями. Не вызывает, однако, сомнения тот факт, что конечные продукты фотолиза зрительного пигмента, ответственные за все дальнейшие события, — это свободный *транс-ретиноаль* и *опсин*.

Известно, что в наружных сегментах палочек содержится специальный фермент — ретинолдегидрогеназа, который превращает ретиноаль в ретинол (витамин A₁).

Характеризуя процесс в целом, следует подчеркнуть, что в интервале физиологических температур все промежуточные реакции протекают *чрезвычайно быстро*. Например, по данным флеш-фотолиза, время образования и жизни прелюмиродопсина $6 \cdot 10^{-12}$ и $3 \cdot 10^{-8}$ с соответственно, а время полупревращения метародопсин I $\rightarrow$ метародопсин II составляет около 30 мкс.

Таким образом, *природа вторичных темновых реакций в комплексе опсин — липид — ретиноаль, вызываемых первичной цис-транс-фотоизомеризацией ретиналя, сводится к цепи последовательных конформационных перестроек, приводящих к изменению микроокружения хромофора, и заканчивается его отрывом от белка*. Чрезвычайно существенно, что рассмотренная последовательность превращений зрительного пигмента характерна не только для дигитониновых экстрактов, но и для суспензии на-

ружных сегментов, изолированной сетчатки и даже глазного бокала.

Перейдем теперь к рассмотрению механизмов *регенерации* зрительного пигмента из продуктов фотолиза. Различают фотохимическую и биохимическую регенерации. *Фотохимическая регенерация*, заключающаяся в образовании родопсина при поглощении света продуктами фотолиза, описана для прелюмиродопсина, люмиродопсина, метародопсина I и метародопсина II. На стадиях прелюмиродопсина и люмиродопсина, которые не сопровождаются существенными конформационными перестройками опсина, фоторегенерация происходит сравнительно легко. Однако конверсия метародопсина I в родопсин заметно контролируется температурой: процесс идет при -20°C , но резко замедляется при -65 и -195°C . Более того, в результате регенерации образуется не исходный продукт родопсин, а две его изохромные формы. При близких спектральных свойствах эти формы родопсина обладают различной температурной стабильностью.

Биохимическая регенерация родопсина изучена слабо. Совершенно очевидно, что для такой регенерации необходимо, по крайней мере, восстановление исходной конформации опсина, окисление ретинола до ретиналя и реизомеризация *транс*-ретиналя в 11-*цис*-форму. После полного выцветания зрительного пигмента в сетчатке глаза животных накапливается свободный ретинол в виде эфира жирной кислоты. В опытах с гомогенатами обесцвеченной сетчатки глаза лягушки, крысы и быка было обнаружено, что весь *транс*-ретинол постепенно превращается в 11-*цис*-форму. Это превращение осуществляется с помощью специального фермента опсин-ретинальизомеразы. Обнаруженная в сетчатке глаза лягушки и быка опсинретинальизомераза не способна катализировать изомеризацию *транс*-ретинала. Поэтому допускается, что стадии изомеризации предшествует окисление ретинола до ретиналя, которое осуществляется с помощью ретинолдегидрогеназы. Предполагается также, что реизомеризация ретиналя может активироваться светом. Заключительный этап ресинтеза — присоединение 11-*цис*-ретиналя к опсину — представляет собой спонтанную реакцию, протекающую при $\text{pH}=5-7$.

4. МЕХАНИЗМЫ РЕАЛИЗАЦИИ ФОТОХИМИЧЕСКИХ ПРЕВРАЩЕНИЙ РОДОПСИНА В ФОТОРЕЦЕПТОРНЫЙ СИГНАЛ

Считается общепринятым, что фотохимические превращения родопсина триггируют ионные перемещения через мембрану фоторецепторной клетки, резко *изменяя мембранный потенциал*. Генерация потенциала при освещении палочек и колбочек зарегистрирована в прямых экспериментах с помощью микроэлектродной техники. Время между вспышкой света и возникновением рецепторного потенциала — порядка миллисекунды. Наличие латентного периода фоторецепторного потенциала свидетельствует о том, что электрофизиологическому ответу предшествует ряд промежуточных темновых реакций. Формы рецепторных потенциалов палочек и колбочек несколько различаются между собой. Для колбочек характерны крутые передние и задние фронты потенциала в ответ на включение и выключение света, для палочек — крутой передний и пологий задний фронты потенциала. Есть все основания считать, что именно мембранный фоторецепторный потенциал представляет собой *первичный нейрофизиологический сигнал*. Следовательно, от единственной молекулы родопсина начинается сложная цепь событий, приводящих к изменению целой зрительной клетки и возникновению зрительного сигнала.

Рассмотрим события, происходящие в период между фотохимической и нейрофизиологической стадией зрительного акта. Из всех продуктов фотолиза родопсина первостепенная роль отводится метародопсину II. По-видимому, именно этот продукт инициирует рецепторный сигнал. Основанием для такого заключения послужили следующие факты.

Как уже отмечалось, наиболее значительные конформационные перестройки опсина происходят как раз при образовании метародопсина II. В отличие от позвоночных у беспозвоночных животных конечным продуктом фотолиза родопсина является не ретиналь + опсин, а метародопсин II. Наконец, специальные измерения показали, что время между вспышкой света и образованием метародопсина II удовлетворительно соответствует времени возникновения так называемого *раннего рецептор-*

ного потенциала в сетчатке глаза, биологическое значение которого рассмотрим более детально.

Ранний рецепторный потенциал, открытый в 1964 г. Брауном и Мураками, по ряду свойств отличается от обычных биоэлектрических потенциалов. Он обладает очень коротким латентным периодом, не свойственным «ионным» потенциалам, и низкой амплитудой (1—4 мВ). Потенциал носит бифазный характер и состоит из двух волн: позитивной (R_1) и негативной (R_2). Амплитуда потенциала градуально растет при увеличении интенсивности света. Непосредственно с уровнем метаболизма потенциал не связан. Поскольку компонент раннего рецепторного потенциала R_1 возникает при температурах ниже -40°C , его образование должно быть обусловлено продуктами, предшествующими метародопсину I. Как известно, при этой температуре превращение родопсина останавливается на стадии люмиродопсина. Поэтому предполагается, что R_1 отражает превращение прелюмиродопсин — люмиродопсин. В свою очередь компонент раннего рецепторного потенциала R_2 обусловлен переходом метародопсин I — метародопсин II. Длительность и температурная зависимость R_2 хорошо коррелируют с аналогичными параметрами распада метародопсина I. Характерно, что спектры действия раннего рецепторного потенциала совпадают со спектрами поглощения зрительного пигмента. Наиболее вероятно, что *ранний рецепторный потенциал* не связан с ионными потоками через мембрану, а *отражает конформационные перестройки в липопротеидном комплексе зрительного пигмента, изменяющие микромозаику электрических зарядов*. Косвенным подтверждением конформационной природы раннего рецепторного потенциала может служить исчезновение его в фоторецепторных мембранах с дезориентированным и денатурированным зрительным пигментом.

Следовательно, к истинному, ионному, рецепторному потенциалу приводят конформационные перестройки родопсина, которые затем распространяются на всю мембрану. В пользу структурных перестроек мембран наряду с возникновением раннего рецепторного потенциала свидетельствуют и другие данные. Так, экстрагируемость липидов гексаном из наружных сегментов палочек сильно различается у темновых и обесцвеченных препа-

ратов. Наименьшее количество липидов извлекается из мембран, содержащих интактный родопсин, наибольшее — из освещенных мембран, содержащих метародопсин II. Мембраны с метародопсином I по экстрагируемости липидов занимают промежуточное положение. Вполне понятно, что степень экстракции определяется доступностью липидов для малополярного растворителя и интенсивностью межмолекулярных взаимодействий липид — мембранная матрица. Иначе говоря, изменения в экстрагируемости липидов указывают на структурную перестройку мембраны.

В последнее время получены и более прямые доказательства индукции светом структурных перестроек в мембранах дисков наружных сегментов палочек. Особенно показательны в этом отношении данные электронно-микроскопической криофрактографии, полученные Абрахамсоном с сотр. Установлено, что распределение и количество внутримембранных частиц на сколах сильно изменяется у обесцвеченных образцов мембран. Аналогичный вывод следует и из результатов проведенного Вашингтоном рентгеноструктурного анализа, показавшего, что свет изменяет «плавучесть» родопсина в жидком липидном бислое: в обесцвеченном состоянии макромолекулы родопсина как бы погружаются в липидную фазу, в темновом — всплывают. Эти эксперименты послужили толчком для исследования структурного состояния липидной фазы в темновых и обесцвеченных мембранах дисков. Однако существенных изменений текучести липидной фазы в ходе индуцированной светом структурной перестройки обнаружить не удалось. Так, было показано, что параметр упорядоченности, определенный для спин-меченых в 6, 10 и 16-м положениях стеариновых кислот (ЭПР-зонды), и микровязкость гидрофобного ядра мембраны (гидрофобный флуоресцентный зонд 1,6-дифенил-1, 3, 5-гексатриен) остаются после обесцвечивания мембран неизменными. Эти результаты свидетельствуют о том, что в индуцированную светом структурную перестройку мембран дисков вовлечена преимущественно не липидный, а белковый компонент мембраны. По-видимому, в основе структурной перестройки лежат изменения белок-липидных и белок-белковых взаимодействий в поверхностных слоях мембраны.

Прямым следствием структурных перестроек мембраны является изменение проницаемости для потенциал-образующих ионов и генерация позднего рецепторного потенциала. В этой связи очень показательны опыты Е. Е. Фесенко с сотр., которым удалось зарегистрировать светозависимое изменение сопротивления лецитин-холестериновых мембран в присутствии фрагментов наружных сегментов палочек сетчатки. В ответ на короткий (1мс) импульс видимого света наблюдалось резкое увеличение проводимости мембраны, причем постоянная времени эффекта в пределах ошибки соответствовала времени превращения метародопсина II.

Рассмотрим, как распределены основные потенциал-образующие ионы Na^+ и K^+ в наружном сегменте палочки. По данным Этингоф и Бонтинга, в наружных сегментах палочек быка содержится около 130 мМ Na^+ и 106—151 мМ K^+ . Часть ионов находится в свободном состоянии, а часть связана с фосфолипидами мембраны. Ионы Na^+ и K^+ во внутридисковом, междисковом и внеклеточном пространстве распределены неравномерно. Так, по данным Бонтинга, во внутридисковом пространстве много K^+ и очень мало Na^+ , а в междисковом пространстве, наоборот, мало K^+ и много Na^+ . Известны данные, свидетельствующие о том, что наружная мембрана палочки проницаема для ионов Na^+ и Cl^- и мало проницаема для ионов K^+ . Благодаря этому по электрохимическому градиенту ионы Na^+ входят в наружный сегмент. В то же время концентрация ионов Na^+ не достигает равновесного состояния вследствие их выталкивания наружу с помощью оубаин-чувствительной Na^+ -, K^+ -АТФ-азы, локализованной во внутреннем сегменте. Как следствие, от внутреннего к наружному сегменту снаружи палочки течет темновой натриевый ток. Действительно, если палочку обработать оубаином, концентрация Na^+ по обе стороны мембраны выравнивается и темновой ток исчезает.

Итак, в отличие от нервных и мышечных клеток *наружная мембрана палочек в темноте не поляризована, а в значительной мере деполяризована*. Небольшой по величине мембранный потенциал палочки имеет положительное значение и составляет +20 мВ (у нервных и мышечных клеток или волокон —50÷100 мВ). Следова-

тельно, в темноте мембрана палочки как бы возбуждена. Характерно, что мембранный потенциал палочек обусловлен в основном движением ионов Na^+ , а не K^+ , как у других клеток.

Известны данные, что при освещении палочки происходит поглощение из цитоплазмы, вход во внутридисковое пространство ионов Na^+ и выход из внутридискового пространства в цитоплазму ионов K^+ . По всей видимости, перемещения ионов связаны с изменением конформации мембран дисков. Освещение приводит также к значительному уменьшению проницаемости наружной мембраны палочки для ионов Na^+ и увеличению ее электрического сопротивления. По данным Бейлора и Фьюотеса, электрическое сопротивление фоторецепторных клеток черепахи на свету возрастает с 17 до 25 МОм. Считается, что основной причиной этого может быть закрытие Na^+ -каналов под влиянием особых медиаторов, выделяющихся при конформационных перестройках мембран дисков. Такими медиаторами, видимо, могут быть ионы Ca^{2+} и циклический гуанозинмонофосфат. Уменьшение проницаемости наружной мембраны для ионов Na^+ , снижение их содержания в цитоплазме у ее внутренней поверхности приводят к гиперполяризации мембраны, характерной для состояния покоя у нервных и мышечных клеток. По-видимому, волна гиперполяризации распространяется по наружной мембране до базального пресинаптического участка палочки, где происходит возбуждение биполярных нервных клеток (рис. 27).

Приведем некоторые экспериментальные факты, подтверждающие эту гипотетическую схему. В опытах Коренброта и Кона (1971 г.), выполненных на «мягко» отделенных целых наружных сегментах палочки, обнаружено, судя по характеру осмотического ответа сегмента на действие света в растворах калиевых и натриевых солей, что мембрана остается малопроницаемой для ионов K^+ , в то время как проницаемость для ионов Na^+ значительно уменьшается. Этими же авторами показано, что один поглощенный фотон, индуцирующий фотохимическую трансформацию одной молекулы родопсина, уменьшает темновой ток в палочке весьма значительно — на 1—3%. Так как темновой ток соответствует входу в па-

лочку около 10^9 ионов Na^+ в секунду, это должно означать, что одно фотохимическое событие сопровождается приостановкой входа в наружный сегмент около 10^7 ионов Na^+ . Выявлена также линейность между уменьшением темнового тока и числом поглощенных фотонов. При высоких интенсивностях наблюдается отклонение от линейности вплоть до насыщения натриевого декремента при 200 поглощенных палочкой фотонах. Вещества, ингибирующие Na^+ - K^+ -АТФ-азу (оубаин) и синтез макроэргических соединений (цианиды), не влияли на изменение проницаемости под действием света. Это означает, что свет влияет не на активный, а на пассивный транспорт ионов натрия. Обнаруженное Коренбромтом и Коном уменьшение пассивного транспорта ионов натрия удовлетворительно коррелирует с увеличением электрического сопротивления клеточной мембраны.

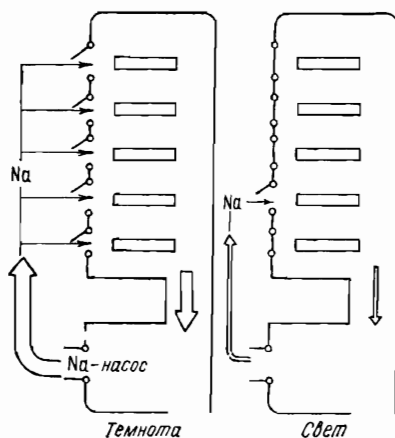


Рис. 27. Схема возникновения рецепторного потенциала в палочках сетчатки

В темноте все Na -каналы в наружной мембране палочки открыты — ток большой; при освещении каналы закрываются, ток уменьшается и мембрана гиперполяризуется

сетчатка глаза лягушки не обнаруживает обычной электро-ретинограммы при отсутствии ионов Na^+ в наружной среде. В дальнейшем было показано, что амплитуда рецепторного потенциала увеличивается прямо пропорционально логарифму концентрации Na^+ . Сходные по смыслу данные приводят также Арден и Эрнст. Введение ионов Na^+ внутрь палочки уменьшало величину световой гиперполяризации мембраны. Последующее восстановление исходного натриевого градиента путем добавления ионов

Na^+ в окружающую среду приводило к нормализации мембранного потенциала.

Рассмотрим теперь более подробно возможные механизмы трансмиссии сигнала от дисков к наружной плазматической мембране. Если трансмиссия сигнала осуществляется химическим путем, то медиатор должен обладать коэффициентом диффузии в водной среде порядка $10^{-5} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ и его равновесная концентрация в палочке, имеющей диаметр 10 мкм, должна устанавливаться за время менее 2 мс. Медиатор должен обладать также высоким сродством к структурам, формирующим каналы пассивной проницаемости ионов в мембране. Этим условиям в фоторецепторной клетке удовлетворяют ионы Ca^{2+} . Первые данные об ионах Ca^{2+} как медиаторе передачи информации от дисков к наружной мембране палочки были получены Йошиками и Хэггинсом. Оказалось, что увеличение концентрации Ca^{2+} от 1,4 до 20 мМ в окружающей среде имитирует действие света. С другой стороны, при помещении палочек в раствор с низкой концентрацией Ca^{2+} (10^{-7} М) значительно искажается световая зависимость фотоответа: для возникновения сигнала необходима энергия, в 10 раз превышающая обычную. Более того, в присутствии кальциевого ионофора X-537A, под действием которого концентрация Ca^{2+} по обе стороны мембраны быстро выравнивается, уже низких концентраций Ca^{2+} (10^{-5} М) достаточно, чтобы подавить темновой ток.

Предполагается, что после освещения Ca^{2+} выходит из дисков, в которых он накапливался в темноте. Прямыми измерениями установлено, что концентрация Ca^{2+} в дисках составляет величину порядка 10^{-3} М , а в междисковом пространстве — 10^{-6} М ; освещение вызывает увеличение концентрации Ca^{2+} в междисковом пространстве на величину $5 \cdot 10^{-7} - 10^{-6} \text{ М}$, что соответствует в пересчете на один поглощенный фотон 3—300 ионам Ca^{2+} .

К сожалению, еще окончательно не выяснен вопрос о механизмах темнового накопления дисками ионов Ca^{2+} , а также светового их высвобождения. По мнению одного из ведущих специалистов в области фотобиологии зрения Бонтинга, в мембранах дисков представлены два типа сайтов, обладающих высоким и низким сродст-

вом к Ca^{2+} . Большую долю связывания обеспечивают сайты низкого сродства (фосфолипиды?). Сайты высокого сродства могут быть элементами системы транслокации Ca^{2+} . На возможное участие системы АТФ-аз в темновом накоплении Ca^{2+} указывает зависимость эффективности процесса от экзогенной АТФ.

Высказывается также предположение, что в качестве химического медиатора структурного сигнала может выступать циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), в присутствии которого проницаемость бислойных липидных мембран для ионов Na^+ увеличивается. Однако в последнее время в качестве одного из возможных кандидатов на роль медиатора сигнала от дисков к наружной мембране рассматривается не циклический аденозинмонофосфат, а циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ), концентрация которого в наружных сегментах примерно на два порядка превышает концентрацию цАМФ. В мембранах наружных сегментов обнаружены и ферменты метаболизма цГМФ — гуанилатциклаза и фосфодиэстераза. Показано, что после освещения концентрация цГМФ в наружных сегментах сильно уменьшается, причем этот эффект связан не с ингибированием гуанилатциклазы, а обусловлен стимуляцией фосфодиэстеразы. Спектр действия этого процесса полностью совпадает со спектром поглощения родопсина. Поскольку изолированная фосфодиэстераза, согласно данным Битенского с сотр., каким-либо ощутимым поглощением в видимой части спектра не обладает и светом не активируется, это указывает на участие эффектов мембранного дальнего действия в фотоиндуцированной стимуляции фосфодиэстеразы.

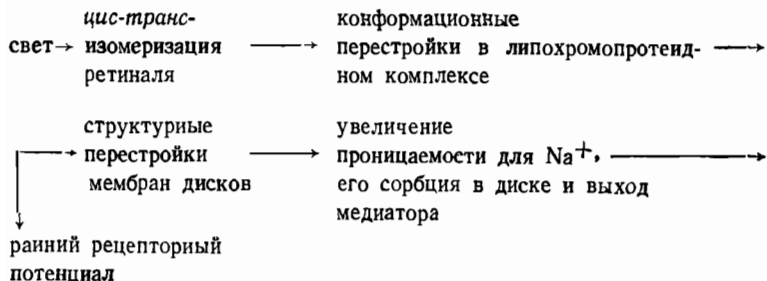
Подсчитано, что при фототрансформации одной молекулы родопсина активируется одна молекула фосфодиэстеразы, которая, в свою очередь, при физиологических условиях гидролизует за 10 мкс лишь восемь молекул цГМФ. Если принять, что в адаптированном к темноте наружном сегменте имеется около 40 000 молекул цГМФ, то очевидно, что только снижением концентрации цГМФ в наружном сегменте передачу сигнала от дисков к наружной мембране объяснить нельзя.

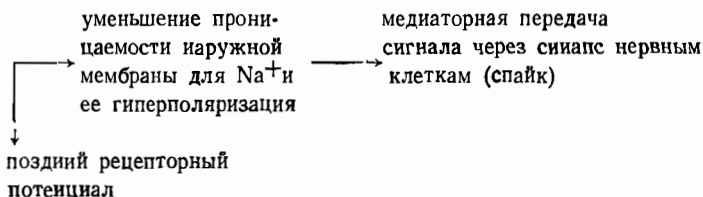
Следует отметить, что наряду с рассмотренной схемой «вторичных процессов рецепции» можно предста-

вить себе и другие механизмы темнового усиления. В основе одного из них, например, может лежать передача структурного сигнала от диска к наружной мембране в виде волны конформационного возмущения. На эту мысль наводит факт, описанный Хэггинсом: изменение проницаемости наружной мембраны наблюдается только в области, непосредственно примыкающей к облученным дискам. И наконец, по мнению ряда исследователей, родопсин входит в состав не только дисков, но и наружной мембраны, следовательно, изменение ее проницаемости может быть обусловлено прямыми фотоэффектами.

После возникновения рецепторного потенциала в зрительной клетке в последующие события вовлекается пресинаптическая область палочек и колбочек и контактирующие с ними отростки горизонтальных и биполярных нервных клеток. На эти нервные клетки сигнал передается с помощью медиатора *ацетилхолина*. В свою очередь биполярные клетки образуют синаптические связи с амакриновыми и ганглиозными клетками. Прямой афферентный путь сформирован из фоторецепторной биполярной и ганглиозной клеток. Горизонтальные и амакриновые нервные клетки обеспечивают коллатеральное, резервное взаимодействие. На уровне нервных клеток и их волокон зрительный сигнал передается с помощью электрического потенциала действия *спайка*, а в местах вторичных синапсов — с помощью *ацетилхолина*.

Резюмируя сказанное, последовательность событий, лежащих в основе фоторецепции, можно представить так:





5. ЦВЕТНОЕ ЗРЕНИЕ

Акцептор цветного зрения (иодопсин) локализован в мембранной системе дисков колбочек. Как и у родопсина, у иодопсина хромофорной группой является ретиналь.

Эти пигменты различаются лишь белковыми носителями — опсинами.

В соответствии с наиболее обоснованной к настоящему времени теорией цветное зрение *трехкомпонентно*. Действительно, в сетчатке глаза обнаружено *три рода колбочек*, ответственных за восприятие синего, зеленого и красного света. Акцепция этих световых потоков осуществляется *тремя видами иодопсина*.

Убедительные доказательства существования трех различных зрительных пигментов (иодопсинов) получены с помощью

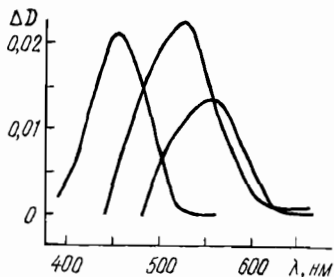


Рис. 28. Дифференциальные спектры поглощения различных колбочек в сетчатке глаза человека (Bown P., Wald G., 1964)

микроспектрофотометрии одиночных колбочек сетчатки глаза (рис. 28). Оказалось, что все исследованные колбочки обладали одним из трех возможных спектров поглощения с максимумами при 445, 535 и 570 нм. При этом три дискретных класса спектров поглощения колбочек обусловлены не различной природой хромофора, а структурными особенностями белковых частей зрительного пигмента — их опсинами. Существование трех типов колбочек подтверждается также электрофи-

зиологическими исследованиями, в которых регистрировалась спектральная чувствительность отдельных колбочек (спектры действия рецепторного потенциала). В этих экспериментах удалось выявить три типа клеток, различающихся по спектральной чувствительности.

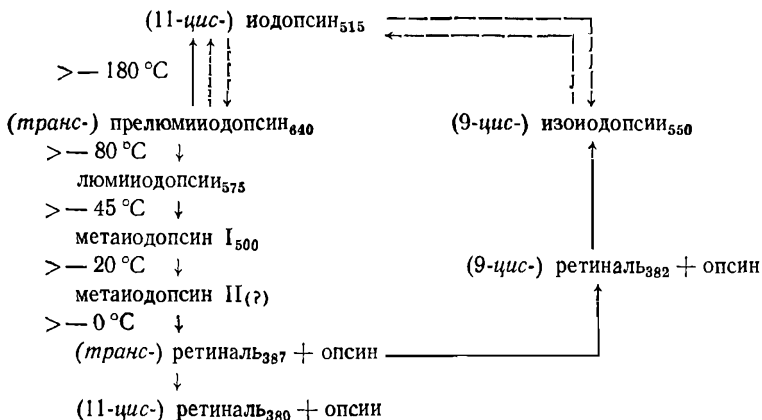
Известно, что при наследственных аномалиях цветного зрения относительно независимо (хотя и с различной частотой) может повреждаться любой компонент цветного зрения, т. е. каждый из белковых носителей запрограммирован своим структурным цистроном ДНК. По-видимому, все три иодопсина различаются первичной структурой своих белковых носителей.

Итак, для нормального зрения человека необходим биосинтез четырех различных белков: опсина палочек, «красного», «зеленого» и «синего» опсинов колбочек. Первичная структура их закодирована в четырех генах, два из которых («красный» и «зеленый») локализованы в женской X-хромосоме. Следует подчеркнуть, что восприятие цветов и их оттенков является функцией всего зрительного анализатора и прежде всего головного мозга, а не только колбочек сетчатки.

Природа фотохимических и фотофизических стадий зрительного акта с участием иодопсинов изучена недостаточно, так как прямое получение препаратов иодопсина из адаптированной к темноте сетчатки довольно сложно. Эта трудность была преодолена Йошизавой и Уолдом, разработавшими для получения иодопсина специальную методику. Из адаптированной к свету сетчатки готовится суспензия зрительных клеток, из которых 20%-ным раствором дигитонина экстрагируют опсин палочек и колбочек. При инкубации смеси опсинов в темноте с избытком 11-*цис*- или 9-*цис*-ретинала белок ассоциирует с пигментом и заново образуются молекулы родопсина и иодопсина. Учитывая, что ретиналь ассоциирует гораздо быстрее с опсином колбочек, Йошизава и Уолд использовали ненасыщающие концентрации пигмента, при которых образовывался только иодопсин. Далее из смеси иодопсин выделяли обычными методами.

После облучения светом иодопсин, как и родопсин, претерпевает последовательные контролируемые температурой превращения. На приведенной ниже схеме представлены обнаруженные Йошизавой и Уолдом промежу-

точные продукты фотолиза иодопсина. Прерывистыми стрелками обозначены световые, сплошными — темновые реакции:



Первая реакция в цепи фотолиза — реакция превращения иодопсина в прелюмиодопсин, включающая изомеризацию 11-цис-формы пигмента в полностью *транс*-форму. Далее последовательно образуются люмиодопсин, метаодопсин I, метаодопсин II. Конечный результат действия света — гидролиз иодопсина на опсин и полностью *транс*-ретиналь. Как и в случае родопсина, каждый из темновых промежуточных продуктов превращения иодопсина стабилен в определенном интервале минусовых температур и обладает специфическим спектром поглощения. Однако в отличие от родопсина промежуточные продукты иодопсина характеризуются двумя основными признаками. Во-первых, в темноте при температуре выше -180°C люмиодопсин легко превращается в иодопсин и, во-вторых, все продукты под действием квантов света при соответствующих температурных условиях способны к прямой реверсии в иодопсин. Прелюмиродопсин, наоборот, к обратному переходу вообще не способен и при увеличении температуры выше -140°C сразу же переходит в люмиродопсин. Аномальное поведение прелюмиродопсина, по мнению Йошизавы и Уолда, обусловлено особенностями структуры белковой части иодопсина.

Опсин колбочек отличается высокой нестабильностью, и это делает возможным его конформационные перестройки даже под влиянием относительно мягких воздействий. Например, обычные температурные сдвиги сопровождаются значительными (до 20 нм) смещениями максимума спектра поглощения иодопсина.

Способность промежуточных форм фотолиза иодопсина к активной реверсии рассматривается в последнее время как один из возможных механизмов световой адаптации колбочек. Дальнейшие события, приводящие к генерации фоторецепторного потенциала в колбочке, совершенно не изучены. Тем не менее можно думать, что эти процессы в колбочках и палочках принципиально близки.

6. ЗРЕНИЕ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

Зрительная рецепция беспозвоночных животных характеризуется рядом особенностей, на которых необходимо остановиться более подробно. В качестве типичного примера возьмем насекомых.

Насекомые имеют сложный фасеточный глаз, лишь отдаленно напоминающий глаз позвоночных. Название «фасеточный» глаз насекомых получил из-за своего покрытия, состоящего из мельчайших шестигранников правильной формы — фасеток. Каждая фасетка — своеобразный хрусталик отдельной зрительной единицы (омматидия). Число зрительных единиц может варьировать у различных насекомых от одного десятка до десятков тысяч. Оси соседних омматидиев расположены друг к другу под углом $1-2^\circ$, поэтому глаз приобретает округлую, сферическую форму. Благодаря такой форме и поверхностному расположению глаза насекомое получает возможность без поворота головы и туловища фиксировать очень большое поле зрения, иногда достигающее 180° .

Изолированный омматидий имеет сложное строение. Он состоит из ряда элементов, совокупность которых формирует его светопреломляющий, светоизолирующий и фоторецепторный аппараты. Светопреломляющий аппарат включает хрусталик и кристаллический конус, а светоизолирующий — слой пигментных клеток, предназначенных для оптической изоляции омматидиев от соседних зрительных единиц. Фоторецепторный аппарат омматидия сформирован из 4—12 зрительных клеток, сгруппированных в плотные пучки, которые называются

ретикулами. В базальной части зрительная клетка переходит в сложное образование рабдомер, имеющий сравнительно небольшие размеры: 2 мкм в диаметре и 100 мкм в длину. В свою очередь рабдомеры объединены в компактную структуру — рабдом.

В этой иерархии сложных структур особое место занимают рабдомер и рабдом. Именно в мембране рабдомера содержится зрительный пигмент, фотохимические превращения которого запускают цепь событий, приводящих к возникновению фоторецепторного сигнала. Кроме того, рабдому отведена функция оптического анализатора поляризации света.

Наряду со способностью улавливать поляризацию света насекомые обладают способностью воспринимать ультрафиолетовый свет вплоть до 250 нм. Очевидно, последняя особенность определяется не характером самой фоторецепции, а опять-таки специфическим устройством глаза как оптической системы, способной пропускать к рабдомам ультрафиолетовый свет.

Хромофорами зрительных хромопротеидов исследованных видов насекомых служат каротиноидные производные ретиналя. Так, у домашней мухи выделен зрительный пигмент с максимумом поглощения при 437, а у пчелы — при 440 нм, причем биологически активный свет поглощается не только простетической группой хромопротеида ($\lambda_{\max}=350$ нм), но и белковым носителем ($\lambda_{\max}=280$ нм).

Действительно, в зрительном хромопротеиде насекомых условия для эффективной миграции энергии по индуктивно-резонансному механизму благоприятны: спектр флуоресценции триптофанилов белка ($\lambda_{\max}=330\div350$ нм) сильно перекрывается спектром поглощения хромофора ($\lambda_{\max}=350$ нм). На эффективную миграцию энергии с белка на хромофор в зрительном хромопротеиде указывают и прямые измерения. В спектрах действия фоторецепции белоглазого мутанта мухи, измеренных Голдсмит и Фернандесом, обнаруживаются два максимума, один из которых принадлежит белку. Тем не менее независимо от того, каким путем возникает электронно-возбужденное состояние хромофора — при поглощении света самой хромофорной группировкой или за счет миграции с белкового носителя,—

в обоих случаях происходит его *цис-транс*-изомеризация.

Дальнейшие темновые события на уровне мембраны рабдомера и зрительной клетки, к сожалению, детально не изучены, но можно думать, что и у насекомых непосредственным результатом фотохимического превращения зрительного пигмента является структурная перестройка мембраны, приводящая к изменениям ее проницаемости для потенциалобразующих ионов.

Первые эксперименты по выяснению природы фоторецепторного потенциала зрительных клеток насекомых были проведены Хэггинсом. В качестве объекта им использовались организмы, в зрительных органах которых представлены достаточно длинные зрительные клетки. Это позволило Хэггинсу облучать небольшие участки рабдома и регистрировать распределение трансмембранного тока по поверхности клетки. При медленном передвижении пучка света по рабдому между двумя регистрирующими микроэлектродами было обнаружено, что изменения тока, происходящие в месте облучения, по характеру соответствуют *деполяризации мембраны*. Оказалось, что у большинства беспозвоночных свет увеличивает проницаемость наружной мембраны к ионам Na^+ , а у некоторых, например американской утки, — к ионам Ca^{++} . Пропорционально деполяризации мембраны под действием света изменяется и электрическое сопротивление рабдома.

Вывод о том, что в основе рецепторного сигнала зрительных клеток не только у насекомых, но и у всех беспозвоночных лежит не *гиперполяризация* рабдома, а ее *деполяризация*, был подтвержден позднее аналогичными измерениями на других представителях этого типа животных.

Рекомендуемая литература

Боровягин В. Л., Островский М. А. Фоторецепторная мембрана и нативный родопсин.— Биофизика, 1971, 14, 350.

Этингоф Р. Н. Родопсин сетчатки: положение и диффузия в мембране, природа.— Успехи биол. наук, 1977, 84, 53.

Этингоф Р. Н. Ферменты сегментов палочек сетчатки: проблема локализации и сопряженности с родопсином.— Цитология, 1978, 20, 5.

Bonting S. L., Deamen F. J. M. Calcium as a transmitter in photoreceptor cells.— In: Transmitter in the visual processes. Oxford, 1976, p. 60.

Deamen F. J. M. Vertebrate rod outer segment membranes.— *Biochim. et biophys. acta*, 1973, 300, 255.

Dratz E. Vision.— In: *The science of photobiology*. N. Y., 1977, p. 211.

Montal M., Korenbrot J. I. Rhodopsin in cell membranes and the process of phototransduction.— In: *The enzymes of biological membranes*. London, 1976, v. 4, p. 365.

Special issue on the chemistry of vision.— *Acc. Chem. Res.*, 1975, 8.

Stone W. L., Dratz E. Visual photoreceptors.— *Photochem. and Photobiol.*, 1976, 24, 79.

Wald G. Visual pigments and photoreceptors — review and outlook.— *Exp. Eye Res*, 1974, 18, 333.

Глава VII. ФОТОТАКСИС И ФОТОКИНЕЗ

1. ФОТОТАКСИС

Как и зрительные реакции, фототаксис относится к информационным фотобиологическим процессам. Под фототаксисом понимают *фотоиндуцированные направленные движения свободных биологических объектов*. Разумеется, приспособительные двигательные реакции высокоорганизованных животных, вызванные световыми сигналами (например, условные и безусловные рефлексы на свет), можно было бы также отнести к реакциям фототаксиса. Мы же рассмотрим в основном фотобиологические реакции, которые осуществляются без участия высокоспециализированных органов зрения и дифференцированной нервной системы.

Различают топо- и фоботаксисы. *Топотаксис* — движение объекта к источнику света (положительный) или от него (отрицательный). К топотаксису относится также *тропфототаксис*, при котором происходит ориентация объектов вдоль или поперек луча (эффект поворота). *Фоботаксис* — перемещение объектов, связанное не с направлением светового луча, а с освещенностью поля. Выход объектов из светового поля рассматривается как отрицательный, а обратный переход (темнота → свет) — как положительный фоботаксис. Явление фототаксиса присуще самым разнообразным представителям животного и растительного мира: простейшим, червям, бактериям, водорослям и др. Фототаксис наблюдается также у внутриклеточных органелл, например у хлоропластов водорослей. В последнее время фо-

тотаксические реакции начали разделять на примитивные и специализированные. Примитивные свойственны автотрофным прокариотическим организмам и тесно связаны с функционированием фотосинтетического аппарата клетки; специализированные, характерные для эукариотических одноклеточных или колониальных организмов, представляют собой самостоятельные фотобиологические реакции, осуществляемые с помощью особого фоторецепторного аппарата.

У организмов, хлоропласты которых очень малы по сравнению со всей клеткой, таксис означает поиск оргanelлой положения, наиболее соответствующего оптимальной (положительный таксис) или неоптимальной (отрицательный таксис) освещенности. У водоросли *Mougeotia*, несущей в себе один большой хлоропласт, фототаксическая реакция заключается во вращении хлоропласта вокруг его длинной оси.

Пигменты, поглощающие биологически активный свет, обычно входят в состав надмолекулярных структур клетки, более или менее равномерно распределенных по всему ее объему. Однако в ряде случаев реакция таксиса иницируется в специализированных фоторецепторных системах, например, в «глазках» эвглени. Обычно они расположены вблизи глотки, сообщающейся с наружным пространством, и окружают нижнюю часть жгутика. Отдельный глазок состоит из красно-оранжевых плотно, беспорядочно упакованных глобул. Глобулы имеют ламеллярное строение и связаны с несущими жгутик структурами — тонкими фибриллами.

Очень часто фототаксическая реакция одноклеточного организма усиливается с ростом интенсивности стимулирующего света. Так, Дин и Толлин обнаружили, что положительный ответ эвглени пропорционален логарифму интенсивности света, по крайней мере, в пределах ее тысячекратного изменения.

При высоких интенсивностях света характер фототаксиса водоросли изменяется — положительный таксис становится отрицательным. Тип отрицательного фототаксиса (топо- или фоботаксиса) определяется главным образом особенностями организма. У *Volvocales* наблюдают только топотаксис, а у *Euglena* — в основном фоботаксис.

При облучении клеток обнаруживается также нейтральная зона, соответствующая переходным интенсивностям света между положительной и отрицательной реакциями. Так, клетки хламидомонады при интенсивности света порядка 10 Вт/м^2 не проявляют четкой направленной реакции на свет или от света, их движения становятся беспорядочными и хаотичными. Учитывая, что таксис проявляется даже при таких низких интенсивностях света, как 10^{-4} Вт/м^2 , можно полагать, что процесс включает в себя эффективные стадии темнового усиления, возможно, сходные со зрительными. Действительно, по данным Уоллеса, достаточно поглощения рецептором семи фотонов света, чтобы вызвать движение жгутика у эвглены.

В литературе обсуждаются возможные механизмы ориентации клеток при топофототаксисе. Каким же образом клетки детектируют направление света: измеряют ли градиент интенсивности света, проходящего через фоторецептор, или же поворачиваются, сравнивая интенсивности света, падающие на фоторецептор под различными углами? Для выбора между этими альтернативными возможностями Файнлейб использовала два экспериментальных подхода. В первом опыте изменялось направление стимулирующего света на 90° и регистрировались положение и ориентация клеток хламидомонады на ленте высокоразрешающего видеоманитофона, смонтированного в окуляр микроскопа. Оказалось, что после введения нового стимула через 0,25—0,5 с клетка начинает поворачиваться, а через 1 с занимает новое положение. Во втором эксперименте клетки водоросли облучались микросекундными импульсами, причем импульсы были настолько кратковременны, что в течение светового промежутка клетка не успевала переориентироваться. Тем не менее сразу же после импульса происходила ориентация всех клеток — поворот их к уже выключенному источнику света той стороной, на которой фоторецептор расположен ближе к поверхности.

Таким образом, эти эксперименты свидетельствуют о том, что выбор направления к свету клетка водоросли осуществляет через измерение градиента интенсивности проходящего через рецептор света.

Как известно, сопоставление спектров действия со спектрами поглощения пигментов позволяет судить о молекулярной природе активных хромофоров. К настоящему времени изучены спектры действия фототаксисов ряда организмов. В противоположность зрительным «фототаксические» пигменты различных биологических объектов имеют различную природу. Это хлорофилл *a*, фикоцианин и фикоэритрин у водорослей; каротиноиды у водорослей и простейших; бактериохлорофилл у бактерий; фитохром у хлоропластов некоторых водорослей.

Более подробные данные по спектрам действия фототаксисов можно найти в обзорах Хэллдала и Гаупта. Приведем некоторые примеры. В спектрах действия положительного и отрицательного топофототаксиса *Platymonas subcordiformis* (рис. 29) представлены максимумы 500, 405, 340, 280 нм и плечо в области 460 нм. На основании сопоставления полученных спектров дей-

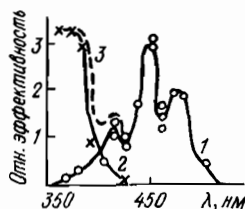
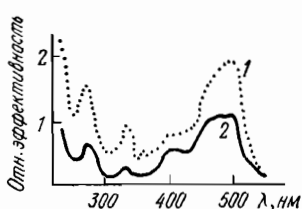


Рис. 29. Спектры действия положительного (1) и отрицательного (2) топотаксиса *Platymonas subcordiformis* (Halldal P., 1961)

Рис. 30. Спектр действия отрицательного фоботаксиса эвглены для поляризованного света (Diehn B., 1969); плоскость поляризации перпендикулярна (1) и параллельна (2) длинной оси организма; суммарный спектр действия (3)

ствия со спектром поглощения каротиноидов было сделано предположение, что молекулярными акцепторами света, приводящего к таксису у этого организма, могут быть каротиноиды. Проявление в спектре действия максимума при 280 нм показывает, что кванты света, поглощаемые ароматическими аминокислотами белков (прежде всего триптофаном), также биологически активны. Скорее всего акцептор света — это *каротинопро-*

теид, в котором происходит эффективная миграция энергии от белковой к хромофорной части.

Необходимо отметить, что даже у одного организма инициация фототаксической реакции может быть связана с различными пигментными системами. Так, спектры действия положительных фобо- и топотаксисов эвглени близки между собой и имеют максимумы при 375 и 480 нм. Эти максимумы не принадлежат одному хромофору, а связаны с двумя различными пигментными системами. Во-первых, гексановые экстракты из глазных пятнышек (стигм) имеют лишь один максимум спектра поглощения, соответствующий длинноволновому максимуму спектра действия. Во-вторых, в опытах с облучением линейно-поляризованным светом выявлены две автономные пигментные системы: 375 и 480 нм. В пределах каждой системы молекулы пигмента упорядоченно ориентированы, но эффективные осцилляторы поглощения двух систем расположены под углом 90° друг к другу. Предполагается, что коротковолновая система образована *флавидами*, а длинноволновая — *β-каротином*. Возможно, однако, что длинноволновая полоса в спектре действия определяется не только *β-каротином*, поскольку из глазных пятнышек *Euglena sanguinea* выделен астаксантин, а у *Euglena gracilis*, кроме *β-каротина*, экстрагированы и идентифицированы неоксантин и антероксантин.

Несколько иную форму имеет длинноволновая часть спектра действия отрицательного фоботаксиса эвглени: она представлена главным максимумом при 450 нм и двумя дополнительными — 480 и 412 нм. Этот же спектр действия, полученный для двух взаимно перпендикулярных составляющих поляризованного света (рис. 30), также выявляет две пигментные системы. Для света, поляризованного перпендикулярно к длинной оси организма, характерна только длинноволновая, для поляризованного параллельно — коротковолновая часть спектра действия. Естественно, что аналогичным образом должны быть ориентированы относительно тела эвглени и молекулы пигментов (их осцилляторы поглощения), образующие две системы.

Итак, мы видим, что на основании приведенных данных еще нельзя сказать, какие именно пигменты — ка-

ротиноиды или флавины — ответственны за поглощение биологически активного света. В спектрах действия различных типов фототаксиса эвглени обнаруживаются как *флавиновые*, так и *каротиноидные* максимумы, поэтому можно думать, что скорее всего спектры действия даже одного типа таксиса представляют собой наложение каротиноидных и флавиновых спектров.

Существует и иная точка зрения. По мнению Дина, биологически активный свет в реакциях таксиса эвглени поглощается флавиновыми пигментами, поскольку спектры действия ее фототаксиса очень похожи на низкотемпературный спектр (77 К) поглощения рибофлавина в этиловом спирте и КJ — ингибитор таксиса — эффективно тушит флуоресценцию флавинов. Вместе с Фрейлихом Дин получил еще одно указание на возможное участие флавиновых пигментов в реакции фототаксиса. В модельных опытах с бислойными мембранами, содержащими рибофлавин, было обнаружено изменение электрического сопротивления мембран после их облучения видимым светом. Характерно, что фотоответ мембран обнаруживал сходную с фототаксической реакцией зависимость от интенсивности света.

В соответствии с точкой зрения Дина о флавиновой природе хромофоров у эвглени находятся результаты опытов Бенедетти и Пэгни, исследовавших спектры флуоресценции парафлагеллярного тела и глазного пятнышка у этой водоросли. Как в спектрах флуоресценции, так и в спектрах возбуждения флуоресценции были выявлены максимумы, свойственные флавиновым, а не каротиноидным пигментам.

Эвглена содержит также много хлорофилловых пигментов. Но, несмотря на это, какого-либо участия в акцепции активного для таксиса света они не принимают. На это указывают не только спектры действия фототаксиса, но и их неизменность у мутантов эвглени, не содержащих хлорофилла.

Совсем другие хромофоры обуславливают фототаксисы у сине-зеленых водорослей. В спектре действия положительного топотаксиса *Phormidium uncinatum* проявляются четыре отчетливых максимума: 400, 495, 560, 610 нм. Максимумы 400, 495, 560 нм можно приписать фикоэритрину, а максимум 610 нм — фикоцианину.

Наблюдаемое несоответствие интенсивностей в полосах поглощения фикоэритрина и в спектрах действия таксиса, вероятно, связано с тем, что спектры действия обычно измеряются на интактных клетках, оптическая плотность которых на фоне эффектов экранировки, светорассеяния и миграции энергии может превышать 0,1—0,2. Это неизбежно должно приводить к искажению истинной «молекулярной» формы спектров действия. Как и у эвглены, фоботаксис у *Phormidium uncinatum* могут вызывать кванты света, поглощаемые другой пигментной системой. Спектры действия этой реакции более сложны по структуре и имеют максимумы в области 670 и 715 нм, принадлежащие, по-видимому, хлорофилловым пигментам. Из нижеприведенных данных хорошо видно, насколько различной может быть природа хромофоров у разных микроорганизмов. Так, у *Halobacterium halobium* фоботаксис обусловлен фотохимическими превращениями в бактериородопсине, у *Cryptomonas* в качестве хромофора рассматривается фикоэритрин, у *Dictyostelium discoideum* — феррохромопротеид, а у *Salmonella typhimurium* — флавины.

Внутриклеточным фототаксическим реакциям хлоропластов в водорослях посвящено большое число исследований, результаты которых обобщены в обзорах Гаупта и Хэллдала. Судя по спектрам действия переориентации хлоропластов, хромофорами для этой фотобиологической реакции у сине-зеленых водорослей *Vaucheria* и *Zemna* могут быть флавины. Более однозначно решен вопрос о природе хромофора у нитчатой зеленой водоросли *Mougeotia*. Многолетними исследованиями Гаупта установлено, что ориентация единственного хлоропласта в клетке этой водоросли контролируется фитохромной системой с четким антагонизмом между красным и дальним красным светом (см. гл. IX). Применение поляризованного К- и ДК-света показало, что осциллятор поглощения P_{660} ориентирован вдоль поверхности клетки, а P_{730} — перпендикулярно к ней. Используя последовательные комбинации К, К+ДК, К+ДК+К-света, можно многократно переориентировать хлоропласт, а с помощью узких микропучков света вызывать его локальные изгибы. Эти данные являются веским аргументом в пользу того, что за поляротропизм

хлоропластов у *Mougeotia* ответствен именно фитохром.

Очевидно, что события, приводящие к таксису, должны начинаться с первичных фотофизических и фотохимических реакций в хромофоре. Однако никаких достоверных данных об этих реакциях (за исключением фитохрома) нет. Не ясно, через какое электронно-возбужденное состояние — синглетное или триплетное — образуются первичные фотохимические продукты и какова их природа. С уверенностью можно утверждать только, что эти продукты не возникают в результате реакции фотоокисления, поскольку фототаксисы не чувствительны к концентрации кислорода, по крайней мере у жгутиковых.

Большое количество работ посвящено изучению молекулярного механизма фототаксиса. По данным Линкса, фототаксическая реакция у водорослей *Polytoma Wella* возникает вследствие быстрого уменьшения концентрации «макроэргов» в моторном аппарате клеток. Причиной этого, как считает Хэллдал, может быть увеличение АТФ-азной активности. Подобная «энергетическая» точка зрения разделялась многими авторами. В частности, Тиббс обнаружил, что в ходе фототаксиса АТФ расходуется в значительно больших количествах, чем это необходимо для простого передвижения клеток.

Предполагаются и другие механизмы индукции подвижности организмов. Согласно данным Ф. Ф. Литвина с сотр., облучение клеток *Haematococcus pluvialis* фототаксически активным светом вызывает комплекс биоэлектрических реакций на их внешней мембране. Свет индуцирует протекание через мембрану постоянного фоторецепторного тока силой до 10—20 пА. Именно такой ток является причиной первичного градуального фоторецепторного потенциала фототаксиса, которому сопутствует изменение проницаемости мембраны для двухвалентных катионов. При превышении порога освещенности локальный биоэлектрический ответ мембраны перерастает в генерализованное возбуждение всей мембраны, что сопровождается блокадой подвижности у жгутиковой водоросли *Haematococcus pluvialis*.

Значительный интерес представляет также соотношение у водорослей таких процессов, как фотосинтез и фототаксис. На основании опытов по торможению фо-

тотаксиса у сине-зеленых водорослей ингибиторами фотосинтеза Нульч предположил, что процессы фотосинтеза и фоботаксической активности взаимосвязаны. Уже в своих первых работах Нульч на основании факта фототаксической эффективности разобщителей транспорта электронов с фосфорилированием высказал предположение, что темновые усилительные процессы, приводящие к двигательной реакции, связаны с фотофосфорилированием. Однако позднее он пришел к выводу, что фоботаксис сопряжен не с фосфорилированием, а обусловлен изменениями внутри цепочки переносчиков электронов преимущественно в пределах второй системы фотосинтеза. Основанием для этого вывода послужило сравнение концентраций различных веществ в окружающей водоросль среде, вызывающих 50%-ное ингибирование фототаксиса и обладающих различными значениями редокс-потенциалов. Эффект модификации таксиса искусственными редокс-системами Нульч объяснял тем, что эти вещества конкурируют за электрон в соответствующих участках электронного каскада Z-схемы.

Однако использование различных разобщителей и ингибиторов для выяснения механизмов темнового усиления фототаксиса имеет один существенный недостаток. Подобные «агенты» нередко представляют собой неспецифические «яды» общего действия, влияющие на способность организмов к фототаксису не вследствие избирательного повреждения усилительного аппарата, а в результате тотального повреждения клетки.

Рассмотрим теперь механизмы темнового усиления фототаксиса у *Halobacterium halobium*. Как уже упоминалось (см. гл. VI), у этого микроорганизма хромофором является бактериородопсин — хромопротеид, в состав которого входит 13-цис-ретиаль. Как и в случае зрительной фоторецепции, свет индуцирует реакцию стереоизомеризации 13-цис-ретиналя, приводящей в конечном счете к транслокации протонов через бактериальную мембрану. С работой протонного «насоса» в мембране сопряжена АТФ-генерирующая система; к двигательному ответу микробной клетки приводит, как считают некоторые исследователи, увеличение концентрации АТФ в клетке.

Совершенно другой механизм фототаксической реакции предлагается для нефотосинтезирующих микроорганизмов. У некоторых представителей этих организмов фоботаксическая реакция инициируется от специальных внутриклеточных образований, чувствительных к изменению градиента ионов.

Хотя фототаксисы разнообразных представителей растительного и животного мира инициируются электронно-возбужденными состояниями самых различных хромофоров, усилительный механизм этих реакций должен быть более или менее универсальным. Этому условию может отвечать следующая цепь событий: свет→хромофор→фотопродукт→структурная перестройка мембран→активация двигательного аппарата→таксис.

В пользу мембранной природы усилительных механизмов говорит следующее. Во-первых, все известные хромофоры так или иначе ассоциированы с клеточными мембранами (ФАД, фитохром, хлорофилл и др.). Во-вторых, фототаксические реакции очень чувствительны к мембранотропным веществам. Так, изменение соотношения интегрирующих целостность мембран двухвалентных катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} сопровождается изменением даже знака фототаксиса. Изложенная мембранная гипотеза сближает усилительные механизмы таксиса и зрения, подчеркивая их органическое родство.

2. ФОТОКИНЕЗ

Близкое к фототаксису явление фотокинеза заключается в увеличении или уменьшении под действием света *подвижности* биологических объектов (соответственно положительный и отрицательный кинезы). Однако в противоположность таксису кинез не сопровождается направленным движением по отношению к источнику света.

Изучение спектра действия фотокинеза показывает, что в роли акцепторов света у различных организмов могут выступать такие пигменты, как хлорофилл *a* у *Cyanophyceae*, фикоцианин у *Phormidium autumnale*, хлорофилл *a* и каротиноиды у *Euglena*.

В спектре действия кинеза эвглены обнаруживаются два выраженных максимума: коротковолновый 460 нм и длинноволновый 640 нм (рис. 31). Первый из них приписывается каротиноидам, второй — хлорофиллу *a*.

Ответные реакции эвглены, вольвокса, хламидомонады и других организмов характеризуются латентным периодом в одну или несколько минут, что указывает на значительную инерционность механизма усиления света.

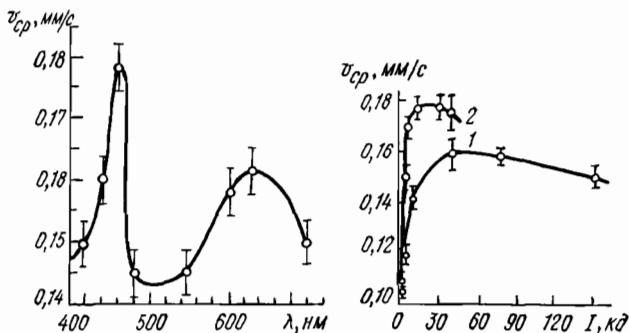


Рис. 31. Спектр действия увеличения подвижности эвглены (Wolken J., Shin E., 1958)

Рис. 32. Зависимость подвижности эвглены от интенсивности неполяризованного (1) и поляризованного (2) света (Wolken J., Shin E., 1958)

Кривая зависимости скорости движения биообъектов имеет сложный характер. По данным Уолкена, у эвглены (рис. 32) при мощности источника света в 15 кд скорость движения линейно зависит от интенсивности света, что указывает на одноквантовый характер процесса в целом. При мощности источника более 40 кд кривая выходит на плато (эффект насыщения), потом заметно снижается.

Характерно, что линейно-поляризованный свет более эффективен, чем неполяризованный, и приводит к более быстрому насыщению эффекта с более высоким уровнем подвижности эвглены. Это означает, что ориентированные в пространстве хромофоры по-разному влияют на подвижность.

В настоящее время никаких данных о фотофизической и фотохимической стадиях этого процесса не имеется. Не ясны и конкретные темновые усилительные механизмы. Из исследований, проведенных Нульчем на пурпурных бактериях и сине-зеленых водорослях, следует, что ускорение движения скорее всего обусловлено генерацией АТФ в ходе фотосинтетического фосфорилирования, а не выделяющимся при фотосинтезе кислородом, как это предполагалось ранее. Такой вывод сделан на основании тормозящего действия на кинез ингибиторов фотосинтетического фосфорилирования — диурана и дезаспидина.

Однако, по-видимому, это не универсальный и не единственный механизм темнового усиления.

Рекомендуемая литература

Синешечков О. А., Литвин Ф. Ф. Фототаксис микроорганизмов, его механизм и связь с фотосинтезом.— Успехи соврем. биол., 1974, 78, 57.

Diehn B. Photomovement of microorganisms.— Photochem. and Photobiol., 1976, 23, 455.

Erlanger B. Photoregulation of biologically active macromolecules.— Ann. Rev. Biochem., 1976, 45, 267.

Litvin F. F., Sineshchekov O. A., Sineshchekov V. A. Photoreceptor electric potential in the phototaxis of the alga *Haematococcus pluvialis*.— Nature, 1978, 271, 476.

Mikolajczyk E., Diehn B. The effect of potassium iodide on photophobic responses in *Euglena*: evidence for two photoreceptor pigments.— Photochem. and Photobiol., 1975, 22, 269.

Perez-Miravete A. Behaviour of microorganisms. London, 1973.

Wolken J. J. Invertebrate photoreceptors. N. Y., 1971.

Глава VIII. ФОТОТРОПИЗМ

По биологическому смыслу фототропизм близок к фототаксису. Фототропизм — индуцированное светом движение части фиксированного биологического объекта. Различают положительный (движение к источнику света) и отрицательный (от источника) фототропизм.

Фототропизм наблюдается у самых разнообразных представителей растительного мира: высших и низших растений, в том числе грибов и закрепленных на грунте водорослей, а также у свободно перемещающихся

низших зооорганизмов (*Bryozoa*). Считается, что фототропизм проявляется только у растущих организмов, т. е. реализуется через различия в скоростях деления или увеличения размеров клеток на освещенной и затемненной сторонах растения. Действительно, были зарегистрированы различия в концентрациях гормона роста растений на затемненной и освещенной сторонах проростков овса. В некоторых работах изгибы рассматриваются как результат асимметрических перераспределений тургора в листовой подушечке вследствие игры осмотических потенциалов или изменения вязкости клеточной цитоплазмы.

Фототропные реакции у высших растений, как правило, характеризуются сложной зависимостью от интенсивности видимого света. Рассмотрим, например, фототропную реакцию колеоптиля овса. Выращенные в темноте проростки овса при освещении слабым «боковым» светом изгибаются по направлению к источнику. Угол изгиба пропорционален дозе (It) от 1 до 0,01 Дж/м² при облучении светом с длиной волны в области главного максимума спектра действия (436 нм). По-видимому, биологическая реакция полностью определяется концентрацией одного и того же фотопродукта, образующегося по одноквантовому механизму, что следует из взаимозаменяемости I и t для положительного фототропизма.

При более высоких дозах угол изгиба не увеличивается, а, наоборот, уменьшается, переходя через нуль в область отрицательных значений (отрицательный фототропизм). Начиная с 5 Дж/м² дальнейшее увеличение дозы вызывает второй положительный фототропизм (рис. 33). При этом правило Бунзена — Роско уже не выполняется. Для объяснения «волнообразности» дозных зависимостей логично допустить существование нескольких дискретных пространственно разделенных фоторецепторных систем. Так, фоторецепторная система, ответственная за первый фототропный изгиб, расположена, по-видимому, в кончике колеоптиля, что подтверждается опытами по его затемнению или удалению. Облучение таких колеоптилей, например, дозами света порядка 1 Дж/м² не вызывает никаких изгибов, и только дальнейшее увеличение дозы сопровождается прояв-

лением второй положительной фототропной реакции.

У низших растений (грибов и мхов) фототропно активными органами являются спорангиофоры, которые обнаруживают реакцию двух типов. Так, кратковременное (несколько секунд) освещение спорангиофор *Phycotuses* низкоинтенсивным светом ($\lambda=450$ нм) приводит

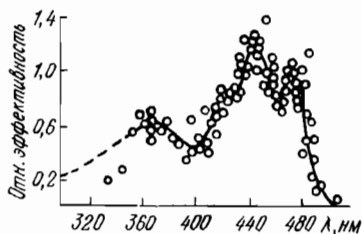
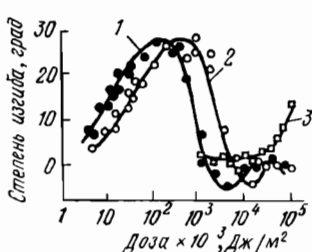


Рис. 33. Зависимость степени фототропного изгиба проростков овса от дозы монохроматического света (Thimann K., Curry G., 1960):

1 — 436 нм; 2 — 365 нм; 3 — второй положительный изгиб

Рис. 34. Спектр действия первой положительной фототропной реакции проростков овса (Thimann K., Curry G., 1960)

только к легкому и обратимому изгибу, а относительно продолжительное освещение (3—4 мин) вызывает положительный изгиб, который, увеличиваясь с ростом интенсивности света, может достигать 90° . Свойственный растениям отрицательный ответ у грибов и мхов при высоких интенсивностях света не наблюдается. У последних возникает так называемая фототропная индифферентность — насыщение фоточувствительной системы. Отрицательный изгиб можно вызвать только облучением ультрафиолетовым светом с $\lambda < 300$ нм. Например, отрицательный фототропный ответ отмечается для конидиофор *Aspergillus giganteus*. У грибов *Pilobolus kleinii* описана и такая особенность фототропной реакции: в ответ на боковое освещение на кончике спорангиофора образуется выпуклость, которая растет в направлении света. В противоположность высшим растениям у грибов за фототропную реакцию ответственна только одна фоторецепторная система. Этот вывод вытекает из характера кривой, отображающей зависимость эффекта от дозы.

Основную информацию о природе хромофоров, ответственных за поглощение биологически активного света, дают спектры действия фототропизмов. Спектр действия первой положительной фототропной реакции проростков овса, изображенный на рис. 34, был измерен Тиманном и Кэри. Фототропные ответы при облучении монохроматическим светом различных длин волн измерялись в области линейной зависимости степени изгиба от интенсивности света. Каждая точка на кри-

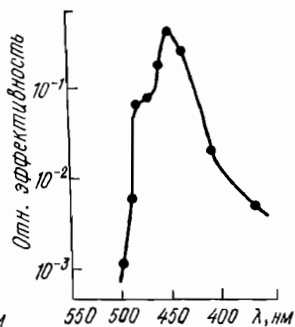
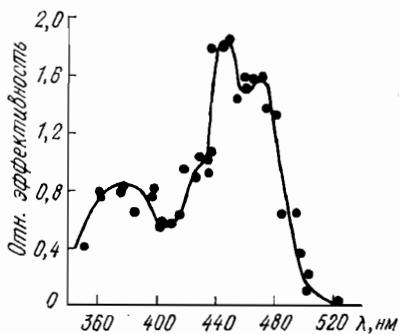


Рис. 35. Спектр действия положительного фототропизма спорангиофор *Physcomyces* (Curry G., Gruen H., 1959)

Рис. 36. Спектр действия положительного фототропизма *Tolypothrix* (Thimann K., 1967)

вой отражает величину изгиба в градусах, приходящуюся на один квант падающего света. В длинноволновой части спектра действия обнаруживаются два максимума (при 445 и 473 нм) и плечо при 425 нм, а коротковолновая часть представляет собой широкую бесструктурную полосу с максимумом при 370 нм. Подобный спектр действия был получен также Шропширом и Уисровым, Эсомонингом и Гэлстоном. Во всех случаях отмечалась одна и та же характерная кривая.

Как и у проростков овса, максимальная фототропная чувствительность у грибов проявляется к синему свету. В спектре действия фототропизма спорангиофор *Physcomyces* (рис. 35) имеются три отчетливых максимума (при 445, 470 и 370 нм) и плечо около 430 нм.

Таблица 8. Характеристики спектров действия фототропизма и спектров поглощения гексановых экстрактов проростков овса

Положение максимума, нм		Отношение высоты максимума к высоте главного максимума	
Спектр действия	Спектр поглощения	Спектр действия	Спектр поглощения
370	—	0,53	—
425	422	0,70	0,78
445	442	1,0	1,00
476	472	0,82	0,88

В спектре действия сине-зеленой водоросли *Tolythrix* (рис. 36) главный максимум расположен при 450, а побочный — при 470—480 нм. Для всех описанных биологических объектов свет с длиной волны 510—520 нм к фототропизмам не приводит.

Рассмотренные спектры действия позволяют сделать вывод о том, что в многообразных фототропных ответах за поглощение биологически активного света ответствен скорее всего только один тип молекул. Действительно, как правило, в спектрах действия представлены две активные зоны — в синей и ультрафиолетовой областях положения основных максимумов у различных объектов совпадают или очень близки.

В литературе рассматриваются две группы основных претендентов на роль хромофоров: каротиноиды и флавины. В первую очередь отмечается большое сходство спектров действия фототропизмов и спектров поглощения каротиноидов. Так, спектры поглощения гексановых экстрактов верхушек колеоптилей овса, содержащих каротиноиды, почти в точности совпадают со спектрами действия фототропного ответа (табл. 8). В то же время гексановые экстракты каротиноидов вообще не поглощают при 370 нм. Исключение составляет *цис*-форма 9,9-моно- β -каротина, обнаруживающая в гексане максимум при 345 нм. Но именно эта форма в растительных клетках не представлена. Поэтому отсутствие поглощения при 370 нм у естественных представителей каротиноидов

является серьезным аргументом против участия этих пигментов в фототропизмах.

Что касается производных рибофлавина, то они имеют в водных растворах две широкие полосы поглощения — при 370 и 445 нм. Однако длинноволновая полоса поглощения рибофлавина в противоположность полосе в спектре действия фототропизма проростков овса не структурирована и соотношения интенсивностей максимумов в спектрах действия и поглощения не совпадают. По данным Хэрбури, характерная для спектров действия структурированность появляется в спектрах поглощения рибофлавина, если его перевести в неполярный растворитель (бензол) или в кристаллическое состояние. Однако сам по себе этот факт не является достаточно веским аргументом в пользу фоторецепторной активности флавиновых пигментов.

Таким образом, простое сопоставление спектров действия фототропизмов со спектрами поглощения каротиноидов и флавинов не позволяет сделать окончательный вывод о том, какие из этих веществ выступают в роли хромофоров.

Поэтому неудивительно, что некоторые исследователи стали говорить о независимом, параллельном участии обоих пигментов в фототропизме или о физически кооперированном их действии через миграцию энергии от рибофлавина к каротиноидам. Однако первое предположение исключается одинаковым наклоном дозных кривых фототропизма для 436 и 365 нм (см. рис. 33), т. е. равенством квантовых выходов процесса при возбуждении светом этих длин волн. Второе предположение теоретически не исключено, но экспериментально не доказано.

Наиболее прямые данные, позволяющие дифференцировать участие этих пигментов в фототропизме, получены в опытах на бескаротиноидных мутантах проростков ячменя, спорангиофорах фикомицетов и нейроспоре. Оказалось, что их способность к фототропизму существенно не нарушена. Не изменяется фототропная активность и у проростков овса, выращенных в присутствии ингибиторов синтеза каротиноидов. Так, ЭДТА и гиббереллиновая кислота снижают содержание каротиноидов в проростках на 75%, не влияя на фототропизм.

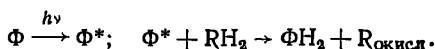
Таким образом, хотя вопрос о природе хромофоров еще далек от окончательного разрешения, можно думать, что флавиновые пигменты как хромофоры наиболее предпочтительны. Чрезвычайно важным в связи с этим является обнаружение с помощью электронной микроскопии в клетках проростков овса и спорангиофорах *Phycomyces* кристаллических телец, спектр поглощения которых близок к спектру поглощения кристаллического рибофлавина.

Следует отметить, что флавины — не единственные предполагаемые хромофоры у представителей растительного мира. В спектре действия фототропизма мха *Physcomitrium* обнаруживается только одна эффективная область (600—800 нм), которая связывается с *фитохромом*. При этом для фототропной реакции характерны основные взаимоотношения между красным (660 нм) и дальним красным (730 нм) светом, свойственные фитохромной системе. В тех немногих опытах, когда исследователям удавалось отодвинуть спектральную границу действующего света в коротковолновую сторону, была зарегистрирована эффективность света и в области белкового поглощения.

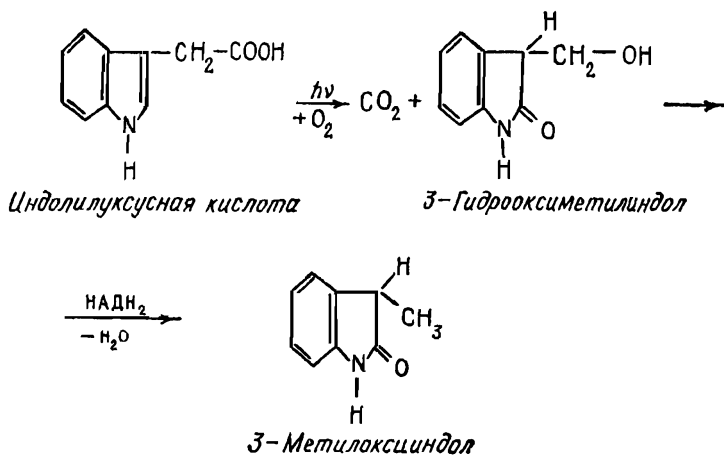
В случаях, когда биологически активный свет поглощается флавиновыми пигментами, фотохимическая реакция фототропизма осуществляется скорее всего с участием их триплетных уровней, поскольку именно через триплетное состояние протекают *in vitro* сенсibilизированные флавином реакции. Участие «триплетов» *in vivo* предполагают и Ценк и Мейер на основании опытов по влиянию КЖ на фототропную реакцию.

Не касаясь природы электронно-возбужденных состояний, все же можно полагать, что фотохимическая реакция, приводящая к биологическому эффекту, протекает по одноквантовому механизму. Это следует из того, что для первой положительной фототропной реакции овса выполняется правило Бунзена—Роско.

Природа первичной фотохимической реакции фототропизма в клетке не известна. Ценк предполагает, например, что флавины как универсальная редокс-система клеток фотовосстанавливаются, окисляя некий интермедиат, существенный для проведения дальнейших реакций по схеме



В роли такого интермедиата могут выступать универсальные гормоны роста растений — ауксины. Предполагается, что возбужденные состояния флавинов сенсibiliзируют деструкцию ауксинов, превращая их в 3-метилоксииндол. Этот вывод основывается на опытах с добавлением к проросткам овса меченого по углероду ауксина (индолилуксусной кислоты) с последующей экстракцией и хроматографическим разделением внутриклеточных веществ после воздействия синим светом, вызывающим фототропную реакцию. Из всех обнаруженных продуктов только 3-метилоксииндол ингибировал рост растений. Подобная реакция происходит и при освещении смеси рибофлавин — ауксин: отмечается поглощение кислорода и выделение углекислого газа за счет сенсibiliзированного пигментом окислительного декарбоксилирования индолилуксусной кислоты:



Известно, что при фототропной реакции проростков овса наблюдается асимметрическое распределение ауксина между их освещенной и затемненной сторонами (концентрационный градиент гормона роста). При этом на освещенной стороне содержание ауксина всегда меньше в случае положительных и больше в случае отрицательных фототропизмов (табл. 9).

Таблица 9. Распределение ауксина на освещенной и затемненной сторонах проростков овса

Интенсивность света, отн. ед.	Фототропный изгиб, град	Распределение ауксина, %	
		со стороны источника света	в тени
0	0	49,9	50,1
20	+10	41,0	59,0
1000	+48	32,0	68,0
1500	+50	17,0	83,0
10000	0	49,0	51,0
11400	-15	62,0	38,0
15000	+20	36,0	64,0

Приведенные данные позволяют заключить, что дозная кривая величины и знака фототропных реакций качественно отражает дозную кривую градиента ауксина в растениях.

Что же является причиной возникновения ауксинового градиента? Как уже отмечалось, ауксиновый градиент может возникать вследствие убыли гормона в ходе его фотодеструкции (фотосенсибилизированное рибофлавином окисление ауксина с квантовым выходом 0,71). Однако в реальных условиях в растении эта реакция вряд ли биологически значима, поскольку для эффективной (на 50%) фотодеструкции индолилуксусной кислоты в пробирке требуются в тысячу раз большие дозы света, чем для первой фототропной реакции у проростков овса. Простые расчеты показывают, что для создания минимально заметного градиента ауксина и порогового изгиба проростка один квант света должен разрушить не менее ста молекул ауксина, т. е. квантовый выход фотореакции в клетках должен быть выше 100.

Кроме сенсибилизированной флавином деструкции ауксина, причинами возникновения бокового концентрационного градиента гормона роста могут быть подавление светом биосинтеза ауксина через инактивацию энзимов или кофакторов в биосинтетической цепи и на-

рушение транспорта ауксина из-за изменений проницаемости клеточных мембран. Первое предположение маловероятно, поскольку свет не оказывает заметного влияния на способность растительных тканей к превращению предшественников ауксина в гормон.

Экспериментально более обосновано второе предположение. В опытах с погружением расщепленных у основания верхушек coleoptилей овса в агаровый акцептор Бриггсу удалось показать, что из затемненной половины проростка в агар диффундируют большие количества ауксина, чем из освещенной. Можно было бы думать, что базипетальный транспорт ауксина (от верхушки к основанию проростка) на освещенной стороне каким-то образом подавлен. Однако, по данным того же Бриггса, концентрация ауксина в клетках затемненной стороны кончика coleoptиля была выше, чем в контроле — клетках неосвещавшегося проростка. Этот факт со всей очевидностью указывает на латеральное перемещение ауксина с освещенной половины проростка на затемненную.

Чтобы исключить возможное возникновение бокового градиента ауксина при изменении скорости вертикального транспорта гормона, Бриггс провел следующий изящный эксперимент. Проростки овса продольно расщеплялись, и между двумя его половинками вставлялось тонкое покровное стекло, которое служило искусственной механической преградой на пути транспорта ауксина. В этих условиях освещение становилось неэффективным — боковой градиент ауксина не выявлялся.

Аналогичные результаты получены Пиккардом и Тимманом, которые, используя экзогенную индолилуксусную кислоту, меченую по углероду, показали возникновение бокового градиента метки при освещении coleoptилей кукурузы и овса.

Итак, свет реализует свое тропное действие через создание *бокового градиента ауксинов*, который обусловлен скорее всего изменением проницаемости клеточных мембран. Очень показательны в связи с этим опыты Хагера и Шмидта. Им удалось установить, что образующийся из ауксина стабильный продукт 3-метил-оксиндол имитирует фототропный эффект. При его

образовании поступление меченой индолилуксусной кислоты в растительную ткань остается неизменным, но выход метки из ткани резко тормозится. Наряду с этим общий метаболизм клетки в присутствии 3-метилоксииндола существенно не нарушается: уровень клеточного дыхания остается прежним.

Можно думать поэтому, что 3-метилоксииндол через избирательную модификацию структуры цитоплазматических мембран оказывает влияние на транспорт ауксинов. Действительно, известно, что 3-метилоксииндол активно комплексируется с белками (по-видимому, мембран), блокируя их сульфгидрильные группы.

Способность парафинового масла, взаимодействующего с поверхностью клеток, инвертировать первую положительную и отрицательную фототропные реакции проростков овса также косвенно указывает на участие мембран в механизмах усиления. Кроме того, известно, что индолилуксусная кислота активно комплексируется с липидами (лецитином), входящими в состав биологических мембран.

Изложенное позволяет представить следующую наиболее вероятную схему событий, приводящих к конечному фототропному эффекту проростков овса или кукурузы: *свет → электронно-возбужденные состояния флавинов → сенсibilизированное окислительное декарбоксилирование индолилуксусной кислоты с образованием 3-метилоксииндола → взаимодействие 3-метилоксииндола с белками мембран с модификацией их структуры → нарушение транспорта ауксинов с появлением их бокового концентрационного градиента → асимметричный рост клеток на освещенной и затемненной сторонах проростка → изгиб проростка.*

Отсюда понятно, почему один квант света «перемещает» более 100 молекул ауксина. Это происходит благодаря тому, что цепь событий, начинающаяся с поглощения кванта света и оканчивающаяся собственно биологическим эффектом — фототропным изгибом, включает в себя усилительную стадию, в основе которой лежат, по-видимому, перестройки на уровне мембран.

Как уже отмечалось, у высших и низших растений свет, приводящий к тропизму, поглощается одними и

теми же молекулярными акцепторами. Однако первичные фотохимические реакции и последующие усиленные механизмы фикомицетов вряд ли можно связывать с участием ауксинов. Так, содержание индолилуксусной кислоты в спорангиофорах *Phycomyces* достаточно высоко, но боковая ее аппликация (очень эффективная у высших растений) к заметному изгибу не приводит. Какова природа веществ, вовлекаемых в темновые усиленные процессы, приводящие к фототропной реакции фикомицетов, до сих пор еще не ясно.

Одной из разновидностей фототропных реакций являются *поляротропизмы*, обнаруженные у прорастающих спор мхов и папоротников. У этих растений естественный неполяризованный свет не приводит к анизотропному росту филламентов и ризоидов спор. При облучении же линейно-поляризованным светом проростки спор ориентируются в ходе роста под прямым углом к плоскости поляризации света, т. е. к направлению электрического вектора световой волны. Естественным объяснением поляротропизмов может быть упорядоченная пространственная ориентация фоторецептивных пигментов. У *Botrytis cinerea* осцилляторы поглощения пигментов расположены перпендикулярно, а у *Osmunda cinnamomea* — параллельно поверхности клетки.

Для проростков спор *Fusaria hydrometrica* обнаружена еще более сложная картина. Выявлены три фоторецепторные системы: 1) для низких интенсивностей света 10^{-8} — $10^{-3,5}$ Вт/м² с хаотически расположенными хромофорами; 2) для средних интенсивностей 10^{-2} — 10^2 Вт/м² с параллельной ориентацией хромофоров к поверхности клетки; 3) для высоких интенсивностей 10^2 — 10^3 Вт/м² с такой же ориентацией хромофоров, как и у системы 2.

Изучение спектров действия поляротропизмов сильно затруднено из-за нелинейного характера кривых доза — эффект (сигмовидные, двугорбые и другой формы кривые в зависимости от температуры, времени и интенсивности освещения и т. д.). Тем не менее приближенная оценка спектров действия показывает, что в качестве хромофора в этих реакциях могут выступать флавины.

Рекомендуемая литература

Erlanger B. Photoregulation of biologically active macromolecules.— Ann. Rev. Biochem., 1976, 45, 267.

Galston A. W. Plant photobiology in the last half-century.— Plant Physiol., 1974, 54, 427.

Hager A., Schmidt R. Auxin transport and phototropismus. II. Der Hemmechanismus des aus IES gebildeten Photooxidationsproduktes 3-methylindol beim Transport von Wuchsstoffen.— Planta, 1968, 83, 372.

Hand G. W. Photomovement.— In: The science of photobiology. N. Y., 1977, p. 313.

Nebel B. Action spectra for photogrowth and phototropism in protonemata of the moss *Physcomitrium turbinatum*.— Planta, 1968, 81, 287.

Page R. Phototropism in fungi.— In: Photophysiology. N. Y., 1968, v. 3, p. 65.

Pickard B., Thimann K. Transport and distribution of auxin during tropistic response. II. The lateral migration of auxin in phototropism of coleoptiles.— Plant Physiol., 1964, 39, 341.

Pill-Soon Song, Moore T. On the photoreceptor pigment for phototropism and phototaxis: is a carotenoid the most likely candidate.— Photochem. and Photobiol., 1974, 19, 435.

Глава IX. ФОТОМОРФОГЕНЕЗ

Свет оказывает значительное *регуляторное влияние на рост и развитие* растений и микроорганизмов. Такие реакции называются *морфогенетическими*. Несмотря на огромное многообразие и широкое распространение морфогенетических реакций у различных представителей растительного мира, их единой классификации не существует. Свет стимулирует прорастание семян, зацветание растений, окрашивание кутикулы, синтез антоцианов и аскорбиновой кислоты, образование пластид, рост стебля, опадение и разворачивание листьев, образование ризоидов, почек, транспорт веществ из семян, клеточное дыхание, накопление хлорофилла и т. д. Хотя морфогенетические эффекты подчас и напоминают фототропизмы (например, движение листьев), принципиальное различие между ними состоит в том, что фотоморфогенез *не зависит от направленности светового луча* и сопутствующих фототропизмам асимметричных перераспределений факторов роста.

Морфогенетическое действие света наблюдается как у фотосинтетиков (например, высшие и низшие расте-

ния), так и у организмов, не способных к фотосинтезу (грибы). Общей чертой всех фотоморфогенетических реакций является то, что они прямо не связаны с фотосинтезом, т. е. в первооснове по крайней мере начальных стадий биологических эффектов лежит свой структурно-молекулярный аппарат, отличный от фотосинтетического.

1. СПЕКТРЫ ДЕЙСТВИЯ И ФИТОХРОМ

Спектры действия различных морфогенетических реакций (рис. 37) указывают на то, что свет, поглощенный хлорофиллом, не приводит к морфогенетическим

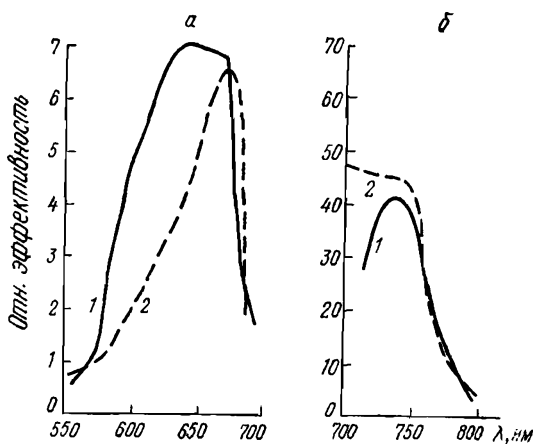
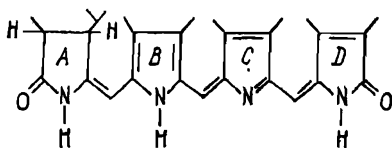


Рис. 37. Спектры действия ускорения (а) и угнетения (б) прорастания семян *Lepidium virginicum* (1) и *Lactuca sativa* (2) (Toole E. et al., 1956)

эффектам. Более того, даже у этиолированных растений, не содержащих хлорофилл, наблюдаются реакции фотоморфогенеза, что полностью исключает его роль в этом процессе. В качестве акцептора света в этом случае выступает особый хромопротеид, получивший на-

звание *фитохрома*. С помощью специфических антител показано его неравномерное распределение в клетке и прочная ассоциация с клеточными органеллами и структурами: твердым цитоплазматическим телом, ядерной мембраной, митохондриями, эндоплазматическим ретикулулом, плазматическими мембранами. Характерно, что фитохром, ответственный в ряде случаев за регуляцию биологических процессов, протекающих в хлоропластах (например, у *Mougeotia*), с их мембранами не связан.

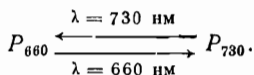
Выделение фитохрома из растений явилось крупным событием в фотобиологии. Фитохром представляет собой хромопротеид с молекулярным весом около 120 000. В некоторых работах приводятся и другие значения: от 60 000 до 240 000, что может быть обусловлено процессами агрегации и дезагрегации субъединиц хромопротеида. Действительно, в работах Бриггса описан эксперимент, в котором фитохром под действием протеаз распадался на компоненты без потери ими биологической активности. Показано, что макромолекула фитохрома имеет форму эллипсоида с отношением длины осей 10:1. В составе фитохрома около 4% углеводов. Полагают, что к белковому носителю, не содержащему дисульфидных мостиков, присоединен тиоэфирной связью билитриеновый хромофор — разомкнутый тетрапиррольный цикл:



По спектрально-абсорбционным (рис. 38) и хроматографическим (R_f) свойствам хромофор фитохрома — фитохромобилин близок к хромофорам фикоцианина. Близки и их спектры флуоресценции (максимум при 690 нм) при возбуждении 660 нм.

Выделенный из растения фитохром может существовать в двух взаимопревращающихся формах, обла-

дающих длинноволновыми максимумами поглощения при 660 (P_{660}) и 730 (P_{730}) нм:



Квантовые выходы прямой и обратной фотоконверсий фитохрома составляют 0,28 для $P_{660} \rightarrow P_{730}$ и 0,20 для $P_{730} \rightarrow P_{660}$. Молярные коэффициенты экстинкции форм P_{660} и P_{730} равны соответственно $7 \cdot 10^4$ и $4 \cdot 10^4$.

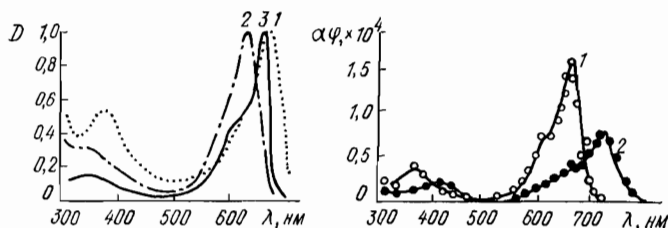


Рис. 38. Спектры поглощения фитохрома (1), фикоцианина (2) и аллофикоцианина (3) из *Plectonema boryanum* (Hendricks S., Siegelman H., 1967)

Рис. 39. Спектры действия конверсии $P_{660} \rightarrow P_{730}$ (1) и $P_{730} \rightarrow P_{660}$ (2) (α — экстинкция, φ — квантовый выход) (Butler W. et al., 1965)

Формы фитохрома различаются также и по своим физико-химическим свойствам. Так, форма P_{730} более чувствительна к денатурирующему действию мочевины и *p*-хлормеркурибензоата, а форма P_{660} быстрее реагирует с альдегидами — формальдегидом и глутаральдегидом.

Вследствие значительного перекрывания спектров поглощения P_{660} и P_{730} и фотообратимого характера реакций при длительном освещении между формами устанавливается динамическое равновесие, при котором их количественное соотношение зависит от длины волны света. Так, для 660 нм $[P_{730}]/[P_{660}]$ равно 0,75—0,81, а для 730 нм — 0,05. Спектр действия реакции $P_{660} \rightarrow P_{730}$ совпадает со спектром поглощения P_{660} , а спектр действия $P_{730} \rightarrow P_{660}$ — со спектром поглощения P_{730} (рис. 39).

В результате индуктивно-резонансной миграции

энергии от ароматических аминокислот белкового носителя к хромофору с эффективностью 30—35% свет, поглощенный белком ($\lambda = 280$ нм), оказывается активным как для прямой, так и для обратной реакции, причем квантовый выход сенсibilизированной фотоконверсии P_{660} также больше, чем квантовый выход сенсibilизированной фотоконверсии P_{730} . Наряду с этим отмечается медленный темновой переход $P_{730} \rightarrow P_{660}$. Эта реакция активируется температурой ($Q_{10} = 2$), НАДН₂, ФАДН₂ и не протекает в отсутствие кислорода, т. е. имеет, вероятно, ферментативную природу с промежуточным этапом окислительно-восстановительных превращений. Реакция сопровождается потреблением энергии (эндергонический процесс, связанный, по-видимому, с расходом АТФ).

Решающее значение для фототрансформации фитохрома имеет не только интактность билитриеновой группировки, но и нативное состояние белкового носителя. Если белок денатурировать, свет не индуцирует никаких спектральных сдвигов. Этим хромофор фитохрома отличается от ретиналя, который, как известно, способен к обратимым фотопревращениям в растворе и в отсутствие белкового носителя.

Полностью подтверждают поведение фитохрома *in vitro* результаты опытов по обратимой стимуляции и ингибированию морфогенетических процессов красным (660 нм) и дальним красным (730 нм) светом. Так, спектры действия ускорения и торможения прорастания *L. virginicum* и *L. sativa* близки к спектрам действия обратимой фотоконверсии фитохрома (см. рис. 37).

Сходным образом спектры действия этиоляции, зацветания и образования семян различных растений представлены широким максимумом в области 640—670 нм. С другой стороны, спектры действия торможения этих биологических эффектов имеют максимум при 730 нм.

Характерно, что для самых разнообразных морфогенетических ответов у различных растительных объектов действие красного (К) и дальнего красного (ДК) света прямо противоположно (антагонистично). При многократном чередовании К- и ДК-освещения биологический

эффект определяется тем светом, который используется последним. Особенно наглядно это видно из опытов Борсвика, который исследовал действие К- и КД-света на прорастание семян салата. Результаты (в процентах) этих опытов могут быть обобщены в следующем виде (слева — характер освещения, справа — всхожесть):

К	70
К+ДК	6
К+ДК+К	74
К+ДК+К+ДК	6
К+ДК+К+ДК+К	76
К+ДК+К+ДК+К+ДК	7
К+ДК+К+ДК+К+ДК+К	81

Непосредственная связь морфогенетического эффекта с фотопревращением форм фитохрома вытекает из данных по измерению дифференциальных спектров поглощения этиолированных растений. Концентрация активных форм фитохрома может быть определена по изменению оптической плотности этиолированных листьев после К- и ДК-освещения:

$$\Delta(\Delta D) = \Delta^K D_{730}^{660} - \Delta^{DK} D_{730}^{660},$$

где $\Delta^K D_{730}^{660}$ — разность оптических плотностей при 660 и 730 нм после К-освещения; $\Delta^{DK} D_{730}^{660}$ — то же после ДК-освещения.

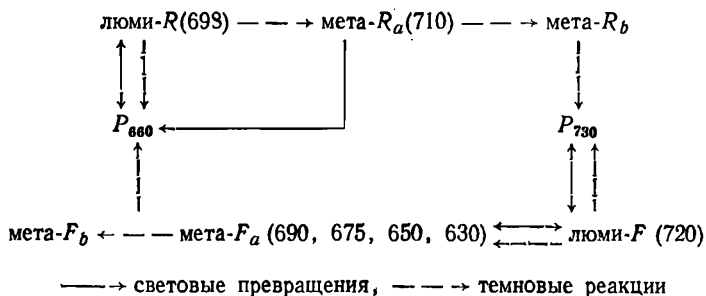
Оказалось, что величина $\Delta(\Delta D)$, т. е. концентрация активной формы фитохрома, хорошо коррелирует с величиной биологического эффекта.

Следовательно, за поглощение биологически активного света ответственны две формы фитохрома, а их взаимопревращение инициирует последующую цепь событий.

Необходимо отметить, что как в растворе, так и в клетке фотообратимые превращения фитохрома подчиняются кинетике реакции первого порядка и, очевидно, протекают по *одноквантовому* механизму.

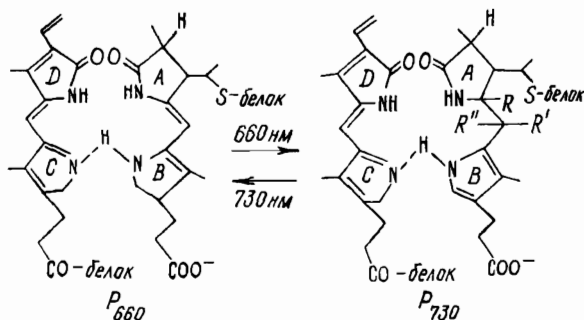
Таким образом, молекулярным акцептором морфогенетически активного света является фитохром, а пер-

вичные фотохимические реакции сводятся к *внутримолекулярным* перестройкам в этом хромопротениде. Однако вопрос о конкретной природе этих перестроек еще далек от разрешения, хотя с помощью флеш-фотолиза при 0°C удалось выявить ряд промежуточных форм в ходе как прямой, так и обратной реакций. В литературе описывается целый набор промежуточных продуктов и промежуточных реакций фотоконверсии фитохрома. Так, согласно последним данным, переход $P_{660} \rightarrow P_{730}$ осуществляется через следующие стадии:



При температуре 77 К продукт люми- R стабилен в темноте, а на свету превращается в P_{660} . При физиологических температурах через ряд промежуточных продуктов люми- R превращается в конечную форму P_{730} . Способностью к реверсии обладает и следующий темновой продукт мета- R_a . Последующие за мета- R_a стадии уже необратимы.

К сожалению, мало определенного можно сказать о природе первичной фотохимической реакции при переходе $P_{660} \rightarrow P_{730}$. На основании теоретической возможности существования билитриеновой группировки в различных стереоформах, а также фотообратимости превращений ранее предполагалось, что первичной фотохимической реакцией может быть фотостереоизомеризация хромофора типа *цис-транс*-превращения. По другим данным, в основе трансформации лежит не пространственное изменение структуры хромофора, а химическая реакция, заключающаяся в превращении насыщенной метинной связи между кольцами А и Б в насыщенную:



Общепринято, что промежуточные продукты превращения фитохрома представляют собой конформеры белкового носителя. Различия в конформации белкового носителя форм P_{660} и P_{730} следуют из кривых дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма в спектральном интервале 200—500 нм. Конформационная перестройка белка в ходе реакции $P_{660} \rightarrow P_{730}$ подтверждается появлением разностных спектров поглощения между P_{660} и P_{730} в области 240—300 нм, что свидетельствует об изменении микроокружения ароматических аминокислот, а также, как уже упоминалось, различиями в устойчивости этих белковых форм к воздействию мочевины и протеолитических ферментов. Кроме того, обнаружено, что после унификации белковых носителей в результате денатурации мочевиной спектры поглощения фотоневротимых (денатурированных) форм фитохрома не различаются между собой.

Обратный переход $P_{730} \rightarrow P_{660}$ также протекает через ряд промежуточных стадий: люми- F , мета- F_a и мета- F_b . Из них два первых продукта фотообратимы.

Прямая и обратная реакции характеризуются не только различными квантовыми выходами, но и различными скоростями (для $P_{660} \rightarrow P_{730}$ $\tau_{1/2} = 2,3$ с, для $P_{730} \rightarrow P_{660}$ $\tau_{1/2} = 6 \cdot 10^{-3}$ с). Вследствие этого в фотостационарном состоянии представлены различные промежуточные формы фитохрома, количество которых определяется параметрами освещения и может достигать 30% от всего фитохромного фонда.

Хотя конформационные перестройки белкового носителя в ходе обратимой фотоконверсии фитохрома не

вызывают сомнения, можно думать, что по своему характеру они далеки от грубых денатурационных преобразований и скорее всего сводятся к таким конформационным переходам, при которых существенным образом не меняется степень упорядоченности белковой макромолекулы. Об этом свидетельствуют небольшие изменения энтропии активации ($\Delta S^* \sim 25$ кал/моль·град) промежуточных стадий фотоконверсии фитохрома в растворе, а также близость гидродинамических и иммунологических свойств P_{660} и P_{730} .

Подведем некоторые итоги. Представляется наиболее вероятным, что первичная фотообратимая фотохимическая реакция билитриена фитохрома, лежащая в основе морфогенетических эффектов, сопровождается конформационными перестройками белка, включенного в состав цитоплазматических мембран.

Для большинства морфогенетических реакций, обусловленных фитохромом, характерно соответствие между величиной конечного биологического макроэффекта и степенью сдвига равновесия в системе $P_{660} \rightleftharpoons P_{730}$, причем в большинстве случаев физиологически активной является форма P_{730} . Многими исследователями выявлена линейная зависимость величины биологического эффекта от логарифма концентрации P_{730} к концу кратковременного освещения. В ряде случаев у этиолированных растений (кукурузы, гороха) обнаруживаются так называемые парадоксы, когда облучение красным светом оказывается эффективным без появления в ткани измеримых количеств P_{730} , но тем не менее антагонистическая активность ДК-света сохраняется. Это заставляет предполагать, что значительная часть молекул, обладающая способностью поглощать свет, физиологически неактивна и только их небольшая фракция инициирует процесс.

Если акцепторы света при морфогенезе, а также первичные фотохимические реакции более или менее выяснены, то вопрос о природе дальнейших стадий реализации биологического эффекта составляет предмет оживленных дискуссий.

Совершенно очевидно, что в первооснове морфологических ответов должны лежать определенные изменения метаболизма. Однако до сих пор не удалось вы-

явить ключевую ветвь метаболизма, на которую в первую очередь действовал бы фитохром. Напротив, создается впечатление, что почти все катаболические и анаболические процессы в клетке подвержены одновременному влиянию фитохрома. Упомянем только о некоторых исследованиях в этом направлении. Установлено, что К- и ДК-свет стимулирует все макромолекулярные синтезы (ДНК, РНК, белок), системы биосинтеза хлорофилла, каротиноидов, антоцианов, органических фосфатов и витаминов (аскорбиновая кислота), ускоряет катаболический распад полисахаридов, жиров и резервных белков, активирует клеточное дыхание и окислительное фосфорилирование в митохондриях. На субклеточном и клеточном уровнях зарегистрирована стимуляция формирования пластид и ламеллярной (мембранной) структуры хлоропластов, а также деления и растяжения клеток.

Для всех отмеченных эффектов характерен антагонизм между К- и ДК-светом (реверсия) при условии введения второго «луча» вслед за красным светом или наоборот, что указывает на их типичную фитохромную природу.

2. МЕХАНИЗМЫ УСИЛЕНИЯ

Итак, все жизненно важные виды клеточного обмена (белкового, нуклеотидного, липидного, углеводного, энергетического) контролируются фитохромной системой. Но для получения физиологического ответа полное превращение всех молекул P_{660} в P_{730} не является обязательным условием. Иногда для достижения 50% биологического эффекта достаточно 2%-ной конверсии неактивных форм фитохрома в активные.

Хотя сам факт биологического усиления в фотоморфогенетических реакциях не вызывает сомнения, вопрос о том, что является первичной биохимической «мишенью», на которую прежде всего действует фитохром, не говоря уже о механизме стыковки фитохром — биохимическая «мишень», остается открытым.

Поскольку фитохром содержится в клетках в ничтожных концентрациях (порядка 10^{-7} М), в 100 —

10 000 раз меньших, чем обычные ферменты, само по себе напрашивается предположение о генерализованном по объему клетки механизме усиления. Положение усложняется еще и тем, что не все фитохромные эффекты имеют одинаковые временные характеристики. Большинству реакций соответствует длительный (часы) латентный период. Однако известны и такие реакции, которые происходят сразу же после освещения. Кроме того, нет общепринятых критериев для разграничения первичных, промежуточных и конечных индуцированных фитохромом эффектов, хотя бесспорно, что прорастание семян или удлинение стебля нельзя считать первичным эффектом. Тем не менее высказывается несколько точек зрения на механизмы биологического усиления.

1. Фитохром выступает в роли регулятора некоего универсального фермента (суперфермента), способного участвовать сразу во многих метаболических реакциях (Н. П. Воскресенская, Мор).

2. Фитохром влияет на работу цепочки переносчиков электрона, тем самым воздействуя на эффективность энергообмена (Борсвик, Хендрикс).

3. Фитохром каким-то образом (возможно, как депрессор ДНК хлоропластов) регулирует активность генетического аппарата клетки через цепочку ДНК — и-РНК (т-РНК) — белок (Мор).

4. Фитохром приводит к кооперативным структурным перестройкам мембран, следствием которых являются скачкообразные изменения проницаемости мембран, конформации и функциональной активности различных ферментов (Л. Н. Белл, Борсвик, Хендрикс).

Рассмотрим эти гипотезы.

1. Данные представления маловероятны по следующим соображениям: а) все известные ферменты строго специфичны и катализируют, как правило, только одну, а не набор многочисленных реакций (суперфермент); б) фитохром мало подходит для роли регулятора из-за своих размеров, превышающих таковые у большинства ферментов (известно, что регуляторные молекулы обычно малы); в) в клетке нет единой пространственной точки, в которой пересекались бы все метаболические пути, следовательно, суперфермент должен локализоваться вблизи всех метаболических центров (митохонд-

рии, рибосомы, ядра, мембраны эндоплазматического ретикулума и т. д.), что также трудно себе представить.

2. Прямое воздействие фитохрома на окислительное фосфорилирование в митохондриях исключается опытами Гордона, которому не удалось обнаружить влияние красного и дальнего красного света на фосфорный обмен митохондрий, выделенных из растений.

3. Мор предполагает, что активная форма фитохрома генерирует некий сигнал, поступающий в ядро клетки к ДНК, который дерепрессирует потенциально активный ген, переводя его в активный, в результате чего происходит переключение в матричном синтезе и-РНК и белков. Это предположение подтверждается усилением фитохромной системой синтеза РНК и белков, включая индукцию синтеза регуляторных биосинтетических ферментов, например, фенилаланинаммонийлиазы, а также подавлением актиномицином (ингибитор синтеза РНК) синтеза антоцианов, происходящего с типичным для индукции белкового синтеза латентным периодом (3 ч). Сходное действие на фотоиндуцируемый синтез антоцианов оказывали также ингибиторы синтеза белка пуромицин и циклогексимид. В опытах Шопфера актиномицин D и пуромицин ингибировали фотоморфогенетические реакции раскрытия гипокотильного колена и разворачивания семядольных листочков у горчицы. Предполагается далее, что фитохром первоначально активирует конституционные гены, программирующие ферменты, участвующие в синтезе аскорбиновой кислоты. В свою очередь аскорбиновая кислота, судя по ряду данных, способна отщеплять гистоны от ДНК, что приводит к вторичной дерепрессии других генов (рис. 40). Первоначальная активация ДК-светом «аскорбинового» гена допускается на основании более короткого (1 ч), чем для антоцианов (3 ч), латентного периода для синтеза аскорбиновой кислоты.

Хотя активация светом генетического аппарата биосинтеза белков и не вызывает сомнений, следует подчеркнуть, что подобный эффект представляет собой не начальный, а один из заключительных этапов действия фитохрома, причем материальная природа сигнала, распространяющегося от фитохрома к ядру клетки, остается невыясненной. Более того, морфогенетические

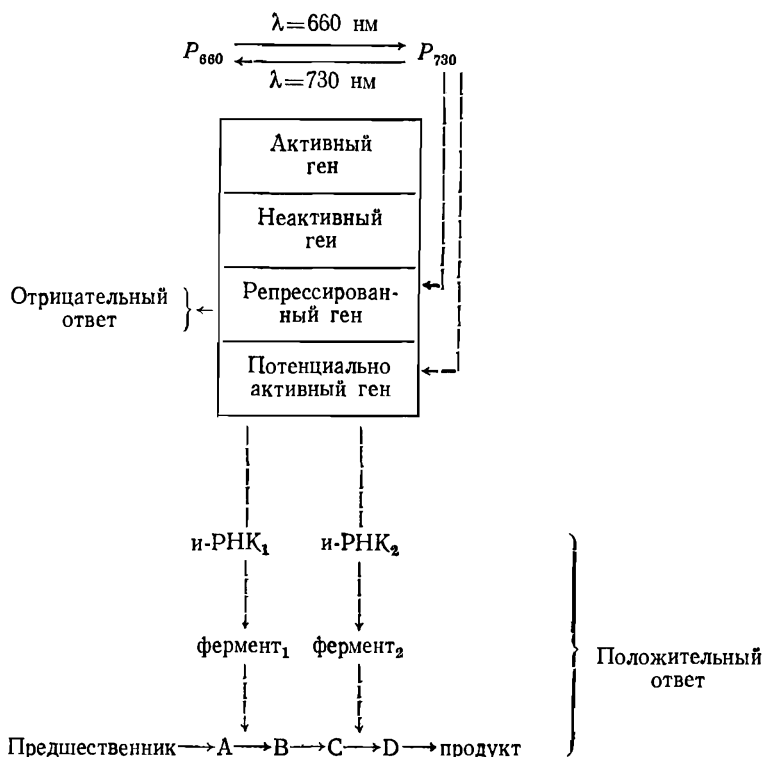


Рис. 40. Схема реализации действия фитохрома через генетический аппарат (Mohr H., 1966)

реакции могут происходить, по-видимому, вообще без участия ядерного аппарата клетки. Так, заметный ответ листьев мимозы и шелковицы на действие красного света происходит столь быстро (5 мин), что становится весьма проблематичной индукция синтеза ферментов, для завершения которой требуются не минуты, а часы.

4. Таким образом, вопрос о способе стыковки фотохимических превращений фитохрома с первичными темновыми метаболическими сдвигами, по существу, остается открытым. В этой связи кажутся привлекательными следующие представления.

Фитохром, ассоциированный с мембраной, как уже отмечалось, после превращения в активную форму меняет конформацию своего белкового носителя. Вслед за этим происходит генерализация локальных конформационных изменений по всей (или значительной части) мембранной системе клетки. Поскольку подавляющее большинство белков и других макромолекул (в том числе ДНК) входит в состав мембран или ассоциировано с ними, структурные перестройки мембран должны отразиться на их конформации, а следовательно, и на их функциональной активности. Одновременно следует ожидать и модификации прямых функций мембран, т. е. проницаемости.

Действительно, было обнаружено, что форма P_{730} более сильно связана с мембранной матрицей, чем форма P_{660} . Эти изменения сродства фитохрома к мембране могут, по мнению ряда исследователей, приводить к модификации проницаемости клеток и, как следствие, к увеличению содержания ионов в окружающей среде. При освещении мимозы отмечено также изменение тургора клеток и возникновение потенциала действия. Обратимые фитохром-зависимые изменения биоэлектрического потенциала мембран проростков фасоли наблюдал также Джаффе. В его опытах К-свет индуцировал положительный, а ДК-свет — отрицательный потенциал, причем ответ регистрировался сразу же после изменения спектрального состава света. Танада отмечал контролируемые системой $P_{660} \rightleftharpoons P_{730}$ резкие и обратимые модификации адгезионных свойств поверхности растительных клеток, что также свидетельствует об изменении структурного состояния мембран. И наконец, в опытах Руа были обнаружены обратимые изменения электрического сопротивления черных липидных мембран после фотохимической модификации инкорпорированного в них фитохрома.

Об участии структурных перестроек мембран в механизмах усиления говорит и тот факт, что для ряда фитохромных эффектов выявлено пороговое количество P_{730} , необходимое для биологического ответа по закону «все или ничего».

На основе подобных представлений легко понять, почему фитохром воздействует сразу на самые разнообразные метаболические процессы, включая активацию ге-

нетического аппарата, в соответствии с разделяемой многими авторами гипотезой Жакоба о регулирующем активностью генома влиянии мембран (гипотеза оперона). С другой стороны, структурная перестройка мембран может вызвать освобождение сорбированного на ней дерепрессора с последующей активацией генетического аппарата.

Четкая формулировка схемы фитохромного эффекта свет→структура→процесс — заслуга Л. Н. Белла, который приводит ряд аргументов в ее пользу. Во-первых, это неспецифичность фитохромного эффекта и возможность его имитации рядом воздействий несветовой природы: действие К-света на прорастание семян заменяется низкими температурами и гиббереллиновой кислотой, а действие ДК-света — актиномицином D. Во-вторых, это распространение сигнала со скоростью, превышающей скорость обычной диффузии.

Подведем некоторые итоги. По-видимому, в клетке представлены два основных механизма усиления действия фитохрома: *генетический и мембранный*. Первый из них характерен для *медленных*, второй — для *быстрых* ответов, например для закрывания листочков у мимозы. Не исключено, что начальные стадии обоих путей

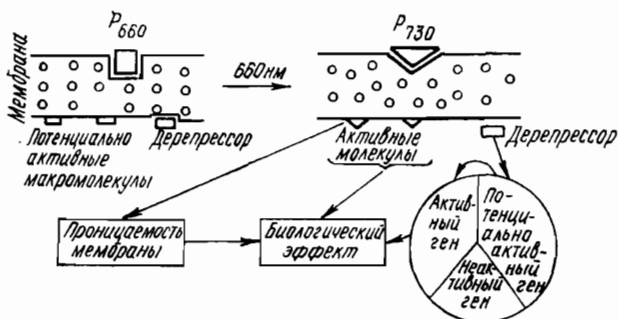


Рис. 41. Возможные механизмы реализации фитохромных эффектов

идентичны и разветвление происходит где-то на последующих этапах. На основании сказанного можно представить себе следующую цепь событий (рис. 41): свет→фитохром→фотохимическая модификация хромосомы, сопровождающаяся конформационными измене-

ниями в белковой части хромопротеида → структурная перестройка мембраны с изменениями функциональной активности ферментов, проницаемости или с диссоциацией медиатора генетического аппарата → биологический эффект.

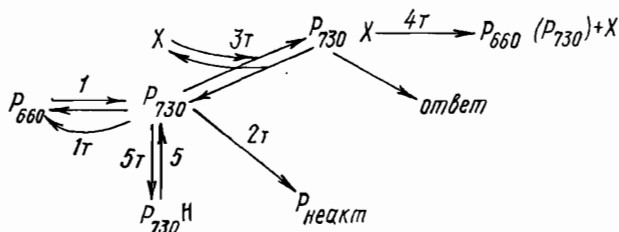
3. СООТНОШЕНИЕ МЕЖДУ ВЫСОКО- И НИЗКОЭНЕРГЕТИЧЕСКИМИ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИМИ РЕАКЦИЯМИ

Ранее мы рассматривали в основном ответы растений на свет, связанные с фитохромной системой. Эти реакции получили в литературе название *низкоэнергетических* (НЭР), поскольку они триггируются поглощением относительно небольших доз света. Известны, однако, и такие фотоморфогенетические процессы, которые наблюдаются при весьма длительном освещении и связаны, следовательно, с поглощением растениями больших доз не только красного, но и синего света. Такие реакции получили название *высокоэнергетических* (ВЭР). Конечные морфологические проявления ВЭР и НЭР нередко совпадают, хотя это и не говорит об идентичности их молекулярных механизмов и даже о фитохромной природе ВЭР.

Как уже отмечалось, ВЭР заметно отличается от НЭР по спектрам действия, в которых наряду с фитохромным максимумом при 720 нм представлен синий максимум при 440 нм. В связи с этим ВЭР иногда называют *синей — дальней красной реакционной системой*. Наличие синего и дальнего красного максимума в спектрах действия означает, что один и тот же биологический эффект определяется двумя автономными хромофорами, причем только один из них фитохром. Убедительное доказательство этому — существование растений, обладающих ВЭР, но не содержащих фитохрома, как это показано Роллиным для семян *Bideus radiata*. Синий свет вызывает растяжение гипокотилей салата, ускоряет рост семядолей и цветение ряда растений. Аналогичным образом в спектрах действия синтеза антоцианов в проростках горчицы наряду с ДК-максимумом (720 нм) представлен и синий максимум (449 нм).

В противоположность низкоэнергетическим высокоэнергетическим реакциям не свойственна К- и ДК-фотообратимость. При этом энергия ДК, необходимая для возникновения биологического эффекта, намного превосходит ту, которая требуется для полного перехода $P_{730} \rightarrow P_{660}$. Предполагается, что акцептором синего света является каротиноид или металл-флавопротеид, например бутирил-коэнзим-А-дегидрогеназа. О весьма своеобразном участии фитохромной системы в реакциях ВЭР заставляют думать следующие факты. Максимальное подавление роста гипокотилей салата наблюдается при освещении ($\lambda = 716$ нм), при котором должно (см. выше) устанавливаться стационарное соотношение $P_{660} : P_{730} = 97 : 3$. К такому же результату приводит освещение двумя лучами (768 и 658 нм), причем такими интенсивностями света, при которых имитируется это соотношение, хотя каждый из этих лучей в отдельности не эффективен. Таким образом, создается впечатление, что для проявления активности фитохромной системы в ВЭР необходимо постоянное взаимопревращение форм $P_{730} \rightleftharpoons P_{660}$ с поддержанием стационарного равновесия на фоне низких концентраций P_{730} .

В последние годы неоднократно предпринимались попытки вскрыть взаимоотношения между системами ВЭР и НЭР, для которых характерны не только синергические, но и антагонистические связи. Приведем модифицированную Борсвиком схему Хартмана:

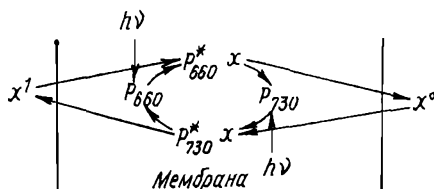


В ней представлены три световые и пять темновых реакций, отмеченных буквой «т». Первая из них представляет собой классический фитохромный переход, $P_{730}X$ — комплекс фитохрома с гипотетическим партнером, $P_{730}H$ — форму фитохрома, возникающую при освещении раст-

воров фитохрома *in vitro* (максимум спектра поглощения при 650 нм), $P_{\text{неакт}}$ — неактивную форму фитохрома, необратимо образующуюся в темноте из формы P_{730} .

Дальний красный свет (максимум спектра действия при $\lambda = 730$ нм) способен вызывать диссоциацию комплекса $P_{730} X$ на P_{660} или P_{730} и X . По существу, эта схема предполагает гетерогенность фонда молекул фитохрома в растении, а $P_{730} X$ может представлять собой комплекс фитохром — модифицированная мембрана.

Более простая «мембранная» схема темнового усиления фитохромных реакций разработана Смитом:



Согласно этой схеме, система $P_{660} \rightleftharpoons P_{730}$ выполняет пермеазную функцию, обеспечивая двусторонний перенос важного метаболита X (например, гормона) через мембрану. При этом предполагается, что для ВЭР (в противоположность НЭР) необходим постоянный перенос X , скорость которого зависит от числа циклов обратимых превращений фитохрома, определяемых, в свою очередь, спектральным составом и интенсивностью света.

Само собой разумеется, что, как и схема Борсвика, схема Смита носит гипотетический характер и лишь формально согласует между собой огромное число разнообразных эффектов К- и ДК-света и их взаимоотношений. Ни одна из схем при этом не рассматривает роль синего света в реакциях типа ВЭР.

Уже сам факт биологической эффективности синего света указывает на то, что фотобиологические реакции, приводящие к морфогенетическому эффекту, не ограничиваются одной фитохромной системой.

Многие низшие растения обладают еще и иной, отличной от ВЭР и НЭР фотосистемой, которая может обеспечивать биологические ответы в отсутствие фито-

хромов. Спорогенез гриба *Stemphylium botryosum* разделяется на две фоточувствительные фазы. Первая из них стимулируется ультрафиолетовым светом (видимо, через белок), вторая, приводящая к образованию конидий, наоборот, тормозится светом. Спектр действия второй фазы имеет максимумы при 280 и 480 нм (плечо при 260 нм). Предполагается, что акцептором света служит флавопротеид. Универсальный характер ингибирующего или стимулирующего действия света на споруляцию и дифференциацию плодового тела различных грибов (несовершенные грибы, фикомицеты, дендеромицеты, базидиомицеты и т. д.) и микроорганизмов показан в ряде работ, обобщенных в обзоре Шропшира.

Как и фитохромная, флавиновая система часто обладает фотообратимостью: по Ланкенсу, свет с длиной волны 600 нм снимает ингибирование второй фазы (образование конидий), что связывается с фотореверсией флавинсептихинона. Что касается механизма усиления, то и в этом случае можно думать о его конформационно-мембранной природе, поскольку эффект ингибирования исчезает при повышении температуры всего на 4° С (от 21 до 25° С). Это указывает на нехимический путь усиления и характерно для кооперативных структурных перестроек мембран. Еще более сложная светоакцепторная система индуцирует образование конидий у *Trichoderma*, о чем свидетельствует спектр действия процесса, имеющий максимумы при 480, 460, 445, 410 и 375 нм.

Таким образом, представители растительного и микробного мира обладают набором достаточно сложных и разнообразных фоточувствительных систем, регулирующих процессы роста и развития организма и управляющих их метаболизмом. Центральное место среди фотосистем занимает фитохромная система.

Рекомендуемая литература

Воскресенская Н. П. Фотосинтез и спектральный состав света. М., 1965.

Гродзинский Д. М. Биофизика растения. Киев, 1972.

Briggs W. R., Rice H. V. Phytochrome: chemical and physical properties and mechanism of action.— Ann. Rev. Plant Physiol., 1972, 23, 293.

Erlanger B. Photoregulation of biologically active macromolecules.— Ann. Rev. Biochem., 1976, 45, 267.

Galston A. W. Plant photobiology in the last half-century.— Plant Physiol., 1974, 54, 427.

Mohr H. Lectures on photomorphogenesis. Heidelberg, 1972.

Mohr H. Advances in phytochrome research.— Photochem. and Photobiol., 1974, 20, 539.

Phytochrome. London, 1972.

Shropshire W. Photomorphogenesis.— In: The science of photobiology. N. Y., 1977, p. 281.

Глава X. ХРОНОБИОЛОГИЯ И ФОТОПЕРИОДИЗМЫ

Ритмические явления в живой природе известны биологам давно. Вполне естественно, что они связывались не только с внутренними причинами, но и регулярно повторяющимися изменениями факторов внешней среды, например суточными колебаниями интенсивности света. Широко известны так называемые цветочные часы К. Линнея. Ему удалось подобрать различные виды растений, которые последовательно раскрывали свои цветки в определенное время на протяжении суток.

Свет играет определенную роль в осуществлении и более длительных годовых ритмов в живой природе (распускание почек у многолетних растений, перелеты птиц и т. д.). Эти, как и многие другие явления, относятся к фотопериодическим реакциям.

В наиболее общей форме под *фотопериодизмом* понимают ритмические изменения самых разнообразных морфологических, биохимических и физиологических свойств и функций организмов под влиянием чередования и длительности световых и темновых интервалов (например, день — ночь). По существу, под фотопериодическим контролем находятся все метаболические и структурные процессы, связанные с развитием и размножением представителей растительного и животного мира.

Можно выделить две основные функции, выполняемые ритмикой света и темноты: 1) триггирование перехода организма в качественно новое физиологическое состояние (например, зацветание растений, выход животных из диапаузы); 2) регулирование биологических

часов (циркадные эндогенные ритмы) таким образом, что они всегда работают в режиме 24-часового цикла.

1. ЦИРКАДНЫЕ РИТМЫ

В основе циркадных ритмов лежат, по-видимому, какие-то периодические биохимические реакции, время цикла которых близко, но не равно 24 ч. Если, например, период внутреннего эндогенного ритма составляет 23 ч, то уже через 12 дней часы будут показывать вместо 12 ч дня 12 ч ночи. С помощью света организмы постоянно проверяют, подстраивают ход своих внутренних часов. Ведущая роль ритмичного чередования световых и темновых интервалов в определении периодичности физиологических ответов подтверждается хотя бы тем фактом, что «дневные» организмы максимально функционируют ночью и минимально днем при искусственной инверсии астрономических световых и темновых периодов. Более того, световой ритмикой можно вызвать принудительное удлинение или укорочение биологических суток, причем эндогенный циркадный ритм восстанавливается вновь при возвращении организма в первоначальные условия. Становится очевидным, что «фотоподзавод» часов осуществляется на основе взаимодействия двух колебательных режимов — биологического и астрономического.

Вместе с тем сами циркадные ритмы являются не приобретенным признаком в онтогенезе. Они генетически детерминированы. Наиболее однозначные доказательства этому дают генетические эксперименты: получены мутантные формы водорослей, микроорганизмов и насекомых, отличающиеся от дикого типа продолжительностью циркадных ритмов.

Итак, основной биологически значимой функцией света является «фотоподзавод» циркадных ритмов, т.е. изменение продолжительности одного цикла или сдвиг фазы ритма.

Известны и другие эффекты действия света на биологические часы. Практически у всех изученных видов сильный свет угнетает эндогенную ритмику. Описан и обратный эффект: включение ритма коротким световым

импульсом у ингибированных длительным пребыванием в полной темноте организмов (микроорганизмы, насекомые).

Имеющиеся экспериментальные данные свидетельствуют о том, что у многих организмов действие света на эндогенную ритмику реализуется не через аппарат зрительной фоторецепции. Этот тезис совершенно очевиден для бактерий и водорослей. (Экстраретинальная рецепция у беспозвоночных и позвоночных будет рассмотрена ниже.)

Попытки установить методом спектров действия природу хромофоров, ответственных за световое регулирование циркадной ритмики, пока не привели к однозначным положительным результатам. Можно только полагать, что в зависимости от таксономической принадлежности организмов эта функция отводится различным хромофорам.

Приведем некоторые примеры. Спектр действия фазового сдвига ритма эклозии у дрозофилы характеризуется широкой бесструктурной полосой с длинноволновой границей при 550 нм; биолюминесценции *Ponyaulax polyedra* — двумя пиками при 470 и 650 нм; откладывания яиц у *Pectinophora* — 480 нм.

По существу, остаются также не ясными молекулярные механизмы действия света на эндогенную ритмику.

2. ФОТОПЕРИОДИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ У РАСТЕНИЙ

По фотопериодическому ответу все растения разделяются на три группы: 1) растения *короткого дня* (зацветание и плодоношение наступает при укорочении дня до 8—12 ч); 2) растения *длинного дня* (тот же эффект достигается удлинением дня до 16—20 ч); 3) *нейтральные* к длине дня растения.

Отсутствие точных данных о спектрах действия фотопериодизма не позволяет сказать что-либо определенное о природе акцептора света. Из существующих гипотез только фитохромная связывает (хотя и без серьезных доказательств) биологическую реакцию с фотопревращениями реального хромофора, поглощающего световую энергию, — фитохрома. Кроме фитохромной, известны

следующие гипотезы: 1) гормональная, связывающая биологический эффект с образованием в индукционном фотопериоде особого гормона цветения флоригена (смесь антезина и гиббереллина); 2) гипотеза эндогенных ритмов Бюннинга, основанная на взаимодействии биологических и астрономических часов; 3) ингибиторная гипотеза фотопериодизма, допускающая образование в растении при неблагоприятных фотопериодических условиях особых ингибиторов цветения.

Однако ни одна из перечисленных гипотез не в состоянии объяснить сложность и многообразие фотопериодических ответов, и все они легко уязвимы для критики. Таким образом, до сих пор остается не ясной наиболее интригующая загадка фотопериодизма: почему при оптимальных для роста и развития внешних условиях растения короткого дня не зацветают на длинном дне и, наоборот, растения длинного дня — на коротком.

3. ФОТОПЕРИОДИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ У ЖИВОТНЫХ

Разнообразные фотопериодические реакции зарегистрированы для членистоногих (насекомые, клещи), червей, рыб, птиц, млекопитающих и других систематических групп животного мира. Продолжительность дня регулирует в основном процессы, связанные с размножением и эмбриональным развитием (например, диапауза у насекомых, серебристо-черных лисиц), приспособительными реакциями к сезонным условиям (линька у птиц и млекопитающих, рост меха, перелеты птиц, впадение в спячку и т. д.), а также многие другие физиологические, метаболические, морфологические параметры организмов, включая и направленные изменения внутриклеточных органелл.

Механизмы фотопериодических реакций у животных до сих пор не выяснены. На сегодняшний день определенно нельзя даже сказать, с помощью каких органов животные воспринимают фотопериодически активный свет. Наиболее логично было бы думать, что за рецепцию света ответственны органы зрения. Если это так, то спектр действия фотопериодизма должен совпадать со спектром действия зрения (акцепторы света — родо-

псин и иодопсины). Однако имеется целый ряд фактов, противоречащих этому. Так, гусеницы дубового шелкопряда сохраняли способность давать диапаузирующие куколки даже в том случае, когда их органы зрения (стеммы) выжигались или покрывались светонепроницаемым лаком. Аналогичные результаты получены для колорадского жука и для тли *Megoura*. В опытах Лиса по освещению различных участков тела *Megoura* было обнаружено, что только голова насекомого чувствительна к свету. С помощью микропучков света диаметром менее 50 мкм установлена локализация наиболее чувствительных участков на голове: они располагались по ее центру между глазами. Циммерман и Айвес сравнили спектральную чувствительность сложного глаза и ритма вылупливания яиц у *Drosophila pseudoobscura* и обнаружили их заметное расхождение. Сигнал на электроретинограмме индуцировался светом с длиной волны более 600 нм, в то время как длинноволновая граница спектра действия ритма вылупливания находится в области 540 нм.

Аналогичные опыты были проведены и на белоглазом мутанте *Drosophila*, чувствительность глаза которого на три порядка выше, чем у дикого типа. Спектр действия ритма вылупливания у обоих типов мухи практически совпал.

В изящных экспериментах Вильямса и Адкиссона установлено, что экстраретинальные рецепторы, ответственные за терминацию диапаузы шелкопряда, расположены в мозгу. (После трансплантации мозга из головы на верхушку живота для получения биологического ответа необходимо было освещать уже не голову, а живот.)

На основании своих опытов Вильямс и Адкиссон пришли к выводу, что насекомые способны воспринимать свет непосредственно мозгом с помощью специальных *фоточувствительных нейронов*.

Аналогичный вывод был сделан и П. Ф. Беловым, обнаружившим, что ослепленные гусеницы дубового шелкопряда воспринимают свет светочувствительными нервными клетками осязательных волосков (сенсиллы).

Значительное число работ по экстраретинальной рецепции выполнено на ракообразных. Например, показано, что у краба освещение шестого (но не других) абдо-

минального ганглия вызывает появление спайковой активности в нервных волокнах хорды. Оказалось, что в состав этого ганглия входит пара фоторецептивных нейронов, содержащих пигмент, близкий к родопсину.

Способностью к *экстраретинальной рецепции света* обладают и представители *всех пяти классов позвоночных*.

Например, свет, направленный на мозг через глазное отверстие после энуклеации глаза, в равной мере стимулирует развитие половых желез как у оперированных, так и у нормальных животных.

У новорожденных крысят рецептором фотопериодически активного света служит железа Харднера, располагающаяся рядом с глазами.

В опытах, выполненных на птицах, было обнаружено, что стимуляция развития гонад может быть вызвана нанесением на череп радиолюминесцентной краски без использования световых периодических воздействий. Установлено, что экстраретинальные фоторецепторы хирургически ослепленных воробьев обладают очень высокой чувствительностью: для изменения циркадной ритмики двигательной активности были достаточно низкие световые потоки (1 лк), сравнимые с освещенностью, создаваемой луной.

На основании ряда данных сделано заключение о локализации фоторецептора у птиц в специальной мозговой железе — эпифизе. Интересно в связи с этим отметить, что в эволюционном плане эпифиз иногда рассматривается как рудиментарный третий глаз на «затылке», которым когда-то располагали предки современных животных (следовательно, и человека). Приведем некоторые факты.

Условия освещения сильно влияют на морфологические, гистологические и функциональные характеристики эпифиза позвоночных. В частности, в нем регистрируются согласованные с экзогенной световой ритмикой периодические изменения содержания гормонов. Хирургическое удаление эпифиза приводит к сглаживанию или даже исчезновению суточных ритмов гормонов других желез внутренней секреции. Имеются данные о том, что эта же мозговая железа внутренней секреции принимает активное участие в реализационных, физиологических стадиях фотопериодических реакций и у позвоночных животных.

По-видимому, у птиц, как и у млекопитающих, одним из важных медиаторов фотопериодических реакций является эпифизарный гормон — мелантоин. У беспозвоночных (насекомые) фотопериодические реакции также связаны с гормональными эффектами, в которых принимает участие гормон роста — экдизон. Следует также отметить, что кроме желез внутренней секреции функции экстраретинального рецептора у амфибий, рептилий и новорожденных птиц могут выполнять светочувствительные клетки кожи.

Приведенные выше данные о прямой внутримозговой и кожной рецепции света вовсе не означают, что глазное зрение не причастно к фотопериодическим реакциям. По-видимому, у животных представлены две *параллельно и взаимосогласованно действующие фоторецепторные системы*, удельный вес которых зависит от таксономической принадлежности, возраста и физиологического состояния организмов. Известно, например, что и у слепых людей суточный ритм содержания кортизола в крови имеет циркадный характер.

Соотношение между зрительной и экстраретинальной рецепцией в управлении ритмичкой двигательной активности птиц хорошо прослеживается на воробьях. Хотя световая подстройка суточной активности осуществляется и без участия глаз, остановка циркадных ритмов непрерывным мощным светом не наблюдается у ослепленных воробьев даже при использовании световых потоков, в $2 \cdot 10^5$ раза превышающих чувствительность экстраретинального рецептора. Вместе с тем фотопериодический контроль системы размножения воробьев (например, размеры гонад) осуществляется только за счет экстраретинальной мозговой рецепции.

В итоге исследования различных фотопериодических ответов у воробьев было сформулировано положение о существовании трех типов реакций, которые реализуются с участием только мозговых, только зрительных, мозговых + зрительных рецепторов.

Что же известно о природе хромофоров, ответственных за инициацию фотопериодических реакций? Учитывая, что точное определение фотопериодических спектров действия представляет собой весьма сложную методическую задачу, многие исследователи ограничивались соп-

ставлением действия немонахроматического света различного спектрального состава. Так, для насекомых наиболее эффективным оказался не красный, а синий свет, а для фотопериодической регуляции онтогенеза птиц — желто-красный (600 нм), но не зеленый (520 нм). Более или менее точный спектр действия прерывания диапаузы тли был измерен Лисом. Как видно из рис. 42, максимум спектра действия этого процесса расположен при 450—470 нм. Сходный спектр действия с максимумом при 440—450 нм характерен для прерывания диапаузы личинки яблоневой плодовой. В аналогичном спектре действия для личинок комара обнаруживается максимум при 540 нм. Наконец, спектр действия увеличения семенников у уток представлен широкой полосой в области 600—740 нм.

В ряде экспериментов делались попытки установить молекулярную природу экстраретинального акцептора биологически активного света. Циммерман и Голдсмит выращивали дрозофилу на бескаротиноидной среде. У каротиноид-дефицитных особей резко снижалась чувствительность глаза. Однако спектр действия ритма вылупливания яиц существенно не менялся. Этот факт позволил авторам сделать вывод о том, что каротиноиды не входят в состав экстраретинальных рецепторов мухи дрозофилы.

Имеются также данные о том, что молекулярным акцептором света в железах Харднера являются протопорфирины и порфирины.

Таким образом, в рецепции фотопериодически активного света кроме органов зрения могут участвовать клетки головного мозга и нервных ганглиев, а также фоточувствительные дериваты поверхности кожи. Что касается

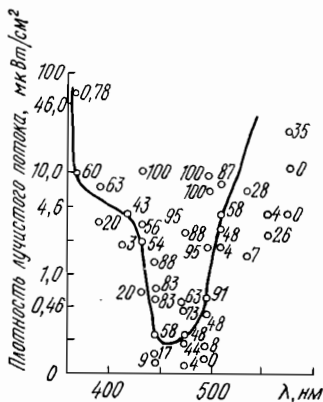


Рис. 42. Спектр действия фотопериодизма тли *Megoura viciae*

Числа на графике показывают процент тлей, претерпевших изменение

механизмов биологического усиления фотопериодических стимулов, то, несмотря на отсутствие точных данных, следует согласиться с высказываемыми различными авторами предположениями, что в их основе лежит сложная цепь нервнорефлекторных и гуморальных реакций.

Рекомендуемая литература

- Б ю н н и н г Е. Суточные ритмы и измерения времени при фотопериодизме в растениях.— В кн.: Биологические часы. М., 1964, с. 409.
- Внешняя среда и развивающийся организм. М., 1977.
- Д а н и л е в с к и й А. С. Фотопериодизм и сезонное развитие насекомых. Л., 1961.
- Ч а й л а х я н М. Х. Факторы генеративного развития. М., 1964.
- Extraretinal photoreception. Symposium on extraretinal photoreception in circadian rhythms and related phenomena.— Photochem. and Photobiol., 1976, 23, 14.
- М е н а к е р М. Extraretinal photoreception.— In: The science of photobiology. N. Y., 1977, p. 227.
- S w e e n e y В. М. Chronobiology (circadian rhythms).— In: The science of photobiology. N. Y., 1977, p. 209.

Глава XI. ФОТОБИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

К фотобиосинтетическим реакциям обычно относятся такие реакции синтеза биологических соединений, которые включают в себя не только ферментативные, но и *ключевую световую стадию*. В цепи последовательных биосинтетических реакций, приводящих к образованию в клетке некоторых пигментов и витаминов, именно фотохимические стадии делают невозможным синтез этих веществ в темноте. Как правило, эти реакции *экзергонические*, и энергия квантов света в основном используется для преодоления энергетического барьера реакции. Запасание энергии света в продуктах реакции или не происходит, или не играет какой-либо самостоятельной биологической роли. Фотохимическая стадия обычно локализуется либо в середине, либо в конце сложной биосинтетической цепи.

Наконец, возможна и такая ситуация, когда фотохимическая реакция необходима для индукции синтеза ферментов, катализирующих определенные стадии биосинтеза веществ.

1. ХЛОРОФИЛЛ

Для фотосинтезирующих организмов характерно постоянное обновление хлорофилла, включающее в себя как разрушение, так и синтез новых молекул пигмента (А. А. Шлык). Исходные продукты для синтеза хлорофилла — аминокислота глицин и янтарная кислота, при взаимодействии которых образуется α -амино- β -кетoadипиновая кислота. Важнейшими этапами биосинтеза хлорофилла являются образование монопиррольных соединений, синтез лейкоформы тетрапирролов, не имеющих сопряженной системы двойных связей и лишенных вследствие этого характерной зеленой окраски, синтез сопряженного форбинного кольца с включением магния и присоединением фитола. Общая цепь химических превращений при биосинтезе может быть представлена в виде следующей схемы: глицин + сукцинил CoA $\rightarrow$ α -амино- β -кетoadипиновая кислота $\rightarrow$ δ -аминолевулиновая кислота $\rightarrow$ порфобилиноген $\rightarrow$ уропорфириноген $\rightarrow$ уропорфирин III $\rightarrow$ протопорфирин IX $\rightarrow$ протохлорофиллид $\rightarrow$ хлорофиллид $\rightarrow$ хлорофилл.

В отсутствие света цепь биосинтеза хлорофилла прерывается на стадии протохлорофиллида, который накапливается в растении в относительно небольших количествах. Именно поэтому растения, выращенные в темноте (этиолированные проростки), лишены обычной зеленой окраски.

На протяжении многих лет считалось, что свет необходим для фотохимического превращения протохлорофилла в хлорофилл. Однако в последнее время твердо установлено, что непосредственным предшественником хлорофилла как у этиолированных, так и у зеленых листьев является не протохлорофилл, а *его бесфитольная форма — протохлорофиллид*. Свет же необходим для превращения протохлорофиллида в хлорофиллид. Так, в опытах Виргина кратковременное освещение этиолированных листьев пшеницы приводило к исчезновению протохлорофиллида с параллельным накоплением хлорофиллида, в то время как количество протохлорофилла не изменялось. А. А. Шлык с сотр., используя метод меченых атомов, установил, что удельная радиоактивность протохлорофиллида при освещении зеленых

листьев уменьшается, а удельная радиоактивность хлорофилла *a* соответственно возрастает. Более того, зеленые листья практически не содержат протохлорофилла: максимально возможное его количество, по крайней мере, на три-четыре порядка ниже, чем протохлорофиллида. Заключительные стадии сложной цепи биосинтеза хлорофилла можно представить следующей реакцией:

$$\text{протохлорофиллид} \xrightarrow{h\nu} \text{хлорофиллид} \rightarrow \text{хлорофилл}.$$

Эта схема справедлива как для зеленеющих этиолированных проростков, так и для «взрослых» зеленых растений, в которых интенсивно протекают процессы обновления (сбалансированного биосинтеза и разрушения) хлорофилла, оптимизирующие уровень активности фотосинтетического аппарата.

В растениях хлорофилл и его предшественники находятся в нековалентном комплексе с белковым носителем, получившим названия протохлорофиллид-, хлорофиллид- и хлорофилл-голохромо́в. Эти комплексы выделены и частично изучены. По данным разных авторов, молекулярная масса белкового носителя, имеющего субъединичное строение, колеблется от $0,4 \cdot 10^6$ до $2 \cdot 10^6$, причем в состав комплекса входит одна-две молекулы пигмента. Для эффективного протекания фотохимической реакции протохлорофиллид $\rightarrow$ хлорофиллид необходим *нативный белковый носитель*; различные воздействия, денатурирующие белок, резко уменьшают скорость фотоконверсии. Свободный пигмент без носителя (в растворе) претерпевает фотохимические превращения со значительно меньшей эффективностью. При этом образуется преимущественно *цис*-форма, не свойственная растениям (Г. П. Гуринович).

На тесную зависимость фотоллабильности протохлорофиллида от свойств микроокружения и состояния хлоропласта указывают и данные, полученные Т. Н. Годневым с сотр., согласно которым обезвоженные проростки ячменя более устойчивы к предельно высоким и низким температурам, чем интактные растения. У таких растений протохлорофиллид способен превращаться в хлорофиллид при более низкой (-90°C) температуре. Если у интактных растений фотоконверсия прекращается при нагревании до $+53$, то у высушенных —

при нагревании до более высоких температур ($+57^{\circ}\text{C}$).

Спектры действия превращения протохлорофиллида в хлорофиллид как в растении, так и в изолированных протохлорофиллид-голохромах близки к спектрам поглощения протохлорофиллида (красный максимум *in vivo* около 650, *in vitro* 639 и синий при 445 нм). Следовательно, основным акцептором фотохимически активного света является *сам протохлорофиллид*, а свет, поглощенный хлорофиллом и каротиноидами, практически не используется для фотоконверсии. Для изолированного протохлорофиллид-голохрома (табл. 10) обнаружен белковый максимум в спектре действия ($\lambda=275$ нм), что свидетельствует о протекании миграции энергии между ароматическими остатками белкового носителя и пигментом.

Таблица 10. Характеристики спектров поглощения протохлорофиллида и спектров действия фотоконверсии протохлорофиллид $\rightarrow$ хлорофиллид

Объект	Положение максимума, нм	Отношение высоты синего к высоте красного максимума
<i>Спектры действия</i>		
Овес	645, 445	1,47
Кукуруза	650, 445	0,66
Протохлорофиллид-голохром	639, 445, 275	4,0
<i>Спектры поглощения</i>		
Протохлорофиллид-голохром	637, 441, 280	4,0
Протохлорофилл в эфире	623, 432, 270	8,3

По-видимому, в зеленом растении реальный вклад белкового поглощения в фотоконверсию протохлорофиллида ничтожно мал, если учесть спектральный состав солнечного света и сильный экранирующий эффект пигментов.

В растениях представлены три основные формы протохлорофилловых пигментов, которые обозначаются P_{650} , P_{635} и P_{628} (индексы указывают на положение мак-

симума поглощения). Следует отметить, что все три формы одновременно встречаются относительно редко и лишь у некоторых представителей растительного мира. Максимумы спектров флуоресценции форм располагаются соответственно при 655, 640 и 631 нм. Спектральные различия форм обусловлены не различиями в химических свойствах пигментов, а *характером микроокружения* вокруг них — природой и интенсивностью межмолекулярных взаимодействий.

А. А. Красновский с сотр. считают, что форма 635 принадлежит мономерному, а форма 650 — агрегированному протохлорофиллиду. Действительно, различные воздействия, приводящие к дезагрегации пигментов, вызывают превращение длинноволновой формы в коротковолновую. По данным других авторов, в различные формы протохлорофилловых пигментов могут одновременно входить как протохлорофилл, так и его бесфитольная форма протохлорофиллид. По-видимому, значительную роль играют также взаимодействия типа белок→пигмент и липид→пигмент.

По мере зеленения растений отмечается уменьшение содержания коротковолновой формы P_{635} и накопление длинноволновой формы P_{650} , которая постепенно становится доминирующей. По данным Сиронваля, форма P_{628} фотонинертна, а формы P_{650} и P_{635} превращаются на свету в различные формы хлорофиллида (P_{635} , P_{675} , P_{650} , P_{684}). При этом P_{650} превращается в хлорофиллид с большей скоростью, чем форма P_{635} . Характерно, что свет, поглощенный P_{650} в растениях с преобладанием P_{635} , судя по спектрам действия, используется для конверсии P_{635} (Годнев, Раскин, Акулович, Орловская). Это на первый взгляд загадочное явление авторы объясняют тем, что в этих объектах формы P_{635} сами по себе фотонинертны и превращаются в хлорофиллид через P_{650} , причем убыль P_{650} сдвигает темновую реакцию $P_{635} \rightarrow P_{650}$ вправо. В конечном счете свет с длиной волны 650 им приводит к фотопревращению формы P_{635} в хлорофиллид. Вслед за образованием небольших количеств хлорофиллида происходит миграция энергии протохлорофиллид → хлорофиллид.

Фотохимическая реакция превращения протохлорофиллид→хлорофиллид заключается в *фотовосстановле-*

нии, присоединении двух атомов водорода у седьмого и восьмого атомов углерода в четвертом пиррольном кольце форбина.

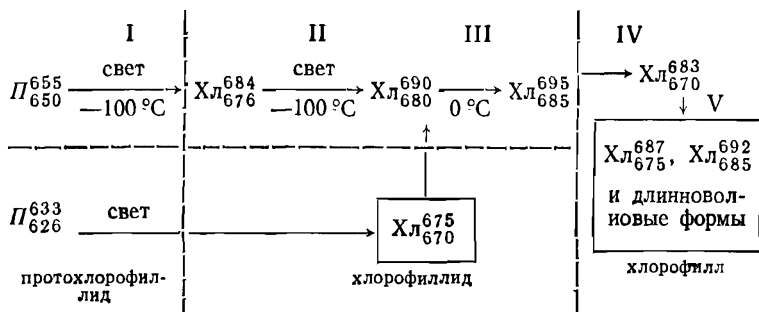
Квантовый выход фотоконверсии впервые был измерен Смитом и Френчем в 1958 г. Авторы работали с разбавленными растворами протохлорофиллид-голохрома, выделенного из листьев фасоли. По их данным, квантовый выход был оценен величиной $0,60 \pm 0,03$. По данным В. И. Раскина, квантовый выход фотореакции у этиолированных листьев кукурузы непостоянен и варьирует в зависимости от возраста и физиологического состояния от 0,25 до 0,6, принимая при подкормке растений δ -аминолевулиновой кислотой, являющейся предшественником протохлорофиллида, значения, близкие к единице.

Природа донора водорода в реакции восстановления протохлорофиллида еще не выяснена. Предполагается, что донорами водорода могут быть НАДН₂, аскорбиновая кислота или белок.

В 1976 г. В. И. Раскин зарегистрировал в спектре поглощения постэтиолированных листьев, освещенных при температуре -120 — -130°C , полосу поглощения при 690 нм, что позволило ему сделать заключение об образовании комплекса с переносом заряда между протохлорофиллидом (P_{650}) и донором электронов.

Используя технику глубокого охлаждения, Ф. Ф. Литвин и О. Б. Беляева пришли к предположению, что световая стадия биосинтеза включает две последовательные фотохимические реакции. В первой из них происходит разрыв двойной связи и образование промежуточного продукта, близкого по своей природе к свободным радикалам семихинонного типа. И только в результате поглощения второго кванта света образуется обычный хлорофиллид.

Однако при обычных температурах процесс фотоконверсии вряд ли имеет двухфотонную природу, поскольку это противоречит высоким значениям квантового выхода реакции ($\Phi > 0,5$). В целом заключительные стадии биосинтеза хлорофилла включают в себя как световые, так и темновые реакции:



Хотя фитолизация хлорофиллида может происходить и в темноте, свет, по данным ряда авторов, способен стимулировать реакцию хлорофиллид $\rightarrow$ хлорофилл.

Необходимо отметить, что процесс биосинтеза пигментной системы не заканчивается реакцией хлорофиллид $\rightarrow$ хлорофилл (см. схему). После образования хлорофилла из предшественников в фотосинтетическом аппарате происходит ряд сложных физико-химических превращений, внешне проявляющихся в так называемом спектральном сдвиге Шибата. Сущность этих реакций заключается в изменении степени агрегации пигментов и характера межмолекулярных взаимодействий с белками и липидами в ходе их включения в липопротеидный матрикс тилакоидной мембраны.

Из зависимости скорости реакции превращения протохлорофиллида в хлорофиллид от интенсивности света следует, что данная реакция протекает по *одноквантовому* механизму скорее всего через *триpletное* возбужденное состояние (последнее следует из данных Г. П. Гуриновича и сотр.).

Согласно данным Бордмана, фотопревращение протохлорофиллида в хлорофиллид не чувствительно к изменениям вязкости среды и мало зависит от температуры. Энергия активации этого процесса в интервале температур от -40 до $+20^{\circ}\text{C}$ составляет 1,3 и несколько возрастает при более низких температурах (от -40 до -70°C), принимая значение 5,2 ккал/моль. Заметное торможение фотоконверсии наблюдается лишь при температуре ниже -80°C . Все эти факты означают, что для протекания реакции *не требуются межмолекулярные активационные столкновения*.

В связи с этим на первый взгляд кажется неожиданным, что кинетика реакции по протохлорофиллиду — зависимость скорости реакции от исходной концентрации протохлорофиллида — подчиняется уравнению реакции не первого, а второго порядка. Этот вывод следует из опытов Смита, Бенитеза, Виргина, Мадсена, Бордмана на этиолированных и А. А. Шлыка на зеленых растениях. Подобная кинетическая закономерность как будто бы должна предусматривать столкновение между двумя молекулами протохлорофиллида — возбужденной и невозбужденной. Противоречие между «световой» и концентрационной кинетикой давно привлекает внимание исследователей.

По мнению Мадсена, в действительности имеет место реакция первого порядка, которая в условиях эксперимента проявляется как реакция второго порядка. Это может быть обусловлено тем, что при малых оптических плотностях количество поглощенного света (т. е. количество электронно-возбужденных состояний) возрастает пропорционально концентрации (C) протохлорофиллида, поскольку $I_{\text{погл}} = I_0 - I_{\text{проп}} = I_0 - I_0 e^{-kC} = I_0(1 - e^{-kC})$. Для малых оптических плотностей $e^{-kC} \approx 1 - kC$ и, следовательно, $I_{\text{погл}} = kI_0C$.

Учитывая пропорциональность скорости конверсии концентрации вещества (для реакции первого порядка) и количеству поглощенной световой энергии, после подстановки в уравнение — $\frac{dC}{dt} = kCI_{\text{погл}}$ вместо $I_{\text{погл}}$ произведения kI_0C получим следующее выражение для скорости процесса:

$$-\frac{dc}{dt} = kCk'CI_0 = kI_0C^2.$$

Однако интерпретация Мадсена не совсем правомочна. Действительно, если столкновения между возбужденной и невозбужденной молекулами протохлорофиллида не нужны, то скорость реакции должна определяться не общим количеством молекул, как это предполагает Мадсен, а лишь количеством электронно-возбужденных состояний, которое линейно, но не квадратично зависит от концентрации протохлорофиллида.

В последнее время исследователи, работающие в области биосинтеза хлорофилловых пигментов, все бо-

лее склоняются к точке зрения о кажущемся характере кинетики реакции второго порядка фотовосстановления протохлорофиллида.

Из опытов Сиронваля, например, следует, что порядок реакции протохлорофиллид→хлорофиллид зависит от длины волны действующего монохроматического света при длительности светового импульса от 1 мс до 1 с. Так, для монохроматического света с длиной волны больше 647 нм фототрансформация протохлорофиллида в этиолированных листьях подчиняется кинетике реакции первого порядка. Второй порядок реакции регистрируется только при освещении светом с $\lambda < 630$ нм. Отсюда следует, что в первом случае наблюдается фотопревращение длинноволновой формы протохлорофиллида (P_{650}), во втором — длинноволновой (P_{650}) и коротковолновой (P_{635}). Этот вывод подтверждается также различным ходом температурной зависимости скорости фотоконверсии выше и ниже -18°C . В конечном счете кинетика реакции второго порядка имитируется в результате наложения двух различных экспоненциальных зависимостей реакции первого порядка.

В опытах Бордмана кажущийся второй порядок реакции объясняется протеканием миграции энергии между протохлорофиллидом и хлорофиллидом *a* в пределах молекулярных групп, в состав которых входит предшественник.

А. А. Шлыком с сотр. убедительно показано, что биосинтез хлорофилла, а следовательно, и процессы фотоконверсии протохлорофиллид→хлорофиллид не распределены равномерно по всему хлоропласту, а локализованы в специфических участках мембранной системы — *реакционных центрах биосинтеза хлорофилла*. Вследствие этого хлорофилловые пигменты возникают сразу группами, причем в первую очередь формируется пигментный аппарат фотосистемы I. Представления об опережающем биосинтезе хлорофилла фотосистемы I основываются на двух основных экспериментальных фактах. Во-первых, легкие частицы хлоропластов, несущие в себе аппарат фотосистемы I, обогащены, судя по данным радиоизотопного анализа, свежесинтезированными молекулами хлорофилла: метка (C^{14}), введенная в растение перед выделением и фракционирова-

нием хлоропластов, используется в первую очередь при синтезе пигментного фонда фотосистемы I. Во-вторых, легкие частицы хлоропластов отличаются повышенным содержанием предшественников хлорофилла — протохлорофиллида и хлорофиллида.

К настоящему времени накопилось достаточное количество фактов, свидетельствующих в пользу того, что функциональная активность реакционных центров биосинтеза хлорофилла *управляется светом*. Накопление протохлорофиллида в темноте происходит лишь до определенного относительно низкого уровня даже при избытке его предшественников в цепи биосинтеза на стадии перед δ -аминолевулиновой кислотой (АЛК). Скорость темнового ресинтеза протохлорофиллида определяется долей его превращения в хлорофиллид под действием света: чем большее количество протохлорофиллида переведено в хлорофиллид, тем с большей скоростью происходит восстановление в темноте исходного фонда протохлорофиллида.

Установлено, что регулируемым звеном является синтетаза δ -аминолевулиновой кислоты, а регулирующим — протохлорофиллид. По-видимому, накопление протохлорофиллида в темноте аллостерическим путем изменяет конформацию АЛК-синтетазы, вследствие чего по принципу отрицательной обратной связи блокируется дальнейший синтез протохлорофиллида. Свет, вызывая реакцию протохлорофиллид $\rightarrow$ хлорофиллид, снимает блок, поэтому скорость ресинтеза протохлорофиллида зависит от степени этого превращения.

По мнению В. Л. Калера, все заключительные стадии биосинтеза хлорофилла локализованы в активном центре одной и той же интегрированной ферментативной системы — олигомере, состоящем из восьми мономерных белковых единиц, причем промежуточные продукты синтеза пигмента постоянно связаны с белком (реакция типа фермент $\rightarrow$ фермент, а не фермент $\rightarrow$ субстрат $\rightarrow$ фермент). Изменение типа ферментативной активности определяется конформационными переходами в олигомере, а вход всего олигомера закрыт до тех пор, пока не завершится реакция протохлорофиллид $\rightarrow$ хлорофиллид $\rightarrow$ хлорофилл. Затем хлорофилл сбрасывается с олигомера и после конформационного перехода вос-

становливаются его исходная структура. Возможно, свет через фотохимическую реакцию протохлорофиллид→хлорофиллид управляет и конформационным состоянием мембран, включающих реакционные центры биосинтеза хлорофилла, определяя тем самым уровень их функциональной активности.

Согласно данным А. Б. Рудого, в цепи биосинтеза хлорофилла высших растений наряду с фотохимической стадией превращения протохлорофиллида в хлорофиллид представлен еще один быстродействующий фоторегулятор. Было показано, в частности, что спустя 4—6 ч после начала зеленения этиолированных проростков появляется новый светозависимый механизм, способный быстро воздействовать на скорость образования первого специфического предшественника хлорофилла — δ -аминолевулиновой кислоты.

Таким образом, в сложной цепи биосинтеза хлорофилла наряду с темновыми ферментативными стадиями представлена световая (фотохимическая) стадия восстановления протохлорофиллида до хлорофиллида, играющая существенную роль в регуляции биосинтеза. Биосинтез хлорофилла осуществляется непрерывно на протяжении всей жизни зеленого растения и обеспечивает поддержание фотосинтетического аппарата в оптимальном функционально-активном состоянии в ходе постоянного обновления пигментного фонда.

2. КАРОТИНОИДЫ

Видимый свет стимулирует биосинтез каротиноидов у бактерий, грибов, дрожжей и высших фотосинтезирующих организмов. Аппарат биосинтеза каротиноидов активируется светом только в присутствии кислорода, причем каротиноиды начинают накапливаться после заметного латентного периода (40 мин) и через 6—8 ч синтез заканчивается. Температура в момент освещения не влияет на каротиногенез ($Q_{10}=1$), а повышение температуры после освещения ему способствует. Следовательно, синтез пигментов запускается простой фотохимической реакцией (скорее всего реакцией фотоокисления) и включает в себя темновые ферментативные стадии. При этом какой-либо связи между каротиноге-

незом и биосинтезом хлорофилловых пигментов не отмечается. Показано, например, что у фотосинтезирующих организмов можно заблокировать синтез хлорофилла *a* специфическими агентами, не снижая при этом стимулирующего действия света на образование каротиноидов. Более того, светоиндуцированный синтез каротиноидов характерен и для гетеротрофных организмов.

В большинстве случаев количество образовавшихся каротиноидов связано с интенсивностью света нелинейной зависимостью. При этом наиболее типичной является

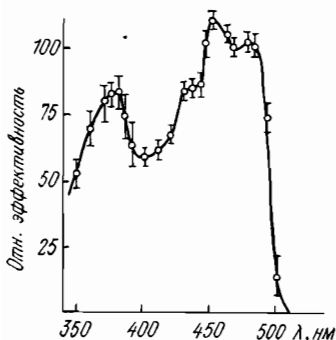


Рис. 43. Спектр действия индуцированного светом синтеза каротиноидов у *Fusarium aquaeductum* (Claes H., 1966)

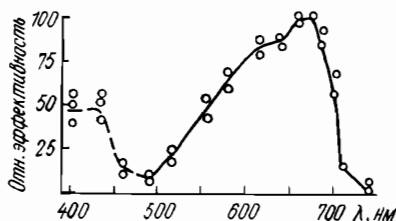


Рис. 44. Спектр действия индукции синтеза каротиноидов у *Chlorella vulgaris* (Rau W., 1967)

ся логарифмическая зависимость. Как правило, ни каротиноиды, ни их предшественники акцепторами активного света не являются. Если судить по спектрам действия, то в качестве хромофоров могут выступать флавины у *Neurospora*, *Fusarium aquaeductum* (рис. 43) и *Mycobacterium*, за исключением *M. marinum*; цитохром *c* у *M. marinum*; хлорофилл у *Chlorella vulgaris* (рис. 44). Участие флавинов в акцепции света у названных биообъектов подтверждается не только спектрами действия (см. рис. 43), но и блокированием эффекта сильными восстановителями (гидросульфитом) и подкислением среды, вызывающим диссоциацию флавопротеидов.

Итак, в основе каротиногенеза лежит *фотосенсибилизированная реакция окисления* некоего интермедиата, причем потребление кислорода в момент освещения больше, чем после него (во время латентного периода). Предполагается, что эта фотореакция у большинства организмов индуцирует синтез ферментов, субстратом которых служит предшественник каротиноидов, накапливающийся в темноте. В пользу этого можно привести следующие аргументы: 1) высокие значения квантового выхода реакции (образование четырех молекул β -каротина на поглощенный квант света у нейроспоры); 2) наличие латентного периода между освещением и накоплением каротиноидов; 3) существование мутантов, синтезирующих каротиноиды в темноте, у которых свет не активизирует синтез; 4) блокирование эффекта фотоиндукции ингибиторами синтеза белка и РНК — хлорамфениколом, циклогексимином, пуромицином.

По-видимому, один из основных предшественников каротиноидов, накапливающихся в темноте, — *фитоин*, который в серии последовательных реакций дегидрирования превращается в каротиноиды.

Рассмотрим более подробно имеющиеся данные о светоиндуцированном каротиногенезе у различных представителей растительного мира.

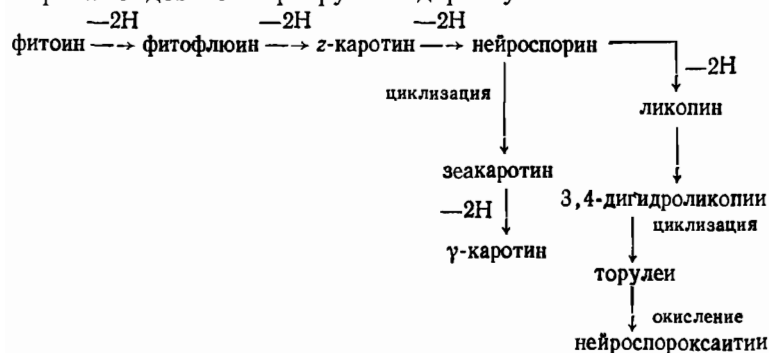
Фотобиосинтез каротиноидов у эвглены характеризуется одной отличительной особенностью. Стимуляция синтеза β -каротина у этого организма происходит только на свету и прекращается сразу после перевода эвглены в темноту. Оптимальное значение pH для биосинтеза у выращенных в темноте клеток равно 6, а у выращенных на свету — 4. В темноте эвглена накапливает большие количества полиенов, фитоина, фитофлюина и z -каротина, но не нейроспорина, ликопина или β -каротина. По мнению Дольфина, ключевой участок — место приложения активирующего агента — находится в цепи биосинтеза после z -каротина. Стимуляция осуществляется с помощью активируемого светом фермента.

У растущего в темноте гриба *Fusarium aquaeductum* с помощью хроматографии удалось выделить только следы каротиноидов: z -каротина, γ -каротина, торулена, нейроспорина и ликопина. Облучение светом сопровождается значительным увеличением содержания всех

этих каротиноидов, причем относительное количество каждого из них возрастает в указанной последовательности в направлении ликопина. В этом же направлении уменьшается и степень ненасыщенности соединений. Анализ данных по ингибированию каротиногенеза циклогексими́дом (ингибитор трансляции), вводимым в среду через различные интервалы времени после освещения, и дифениламином, инактивирующим дегидрогеназы, привел Рау к выводу, что свет стимулирует синтез всех ферментов каротиногенеза между α -каротином и ликопином.

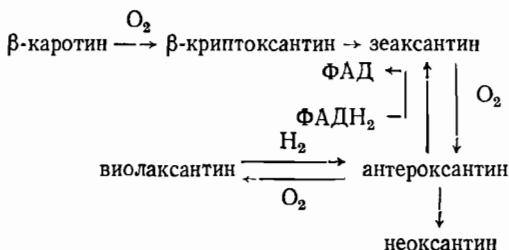
Рау было показано также, что «фотоиндуцированные состояния», включающиеся в цепь синтеза энзимов и ответственные за стимуляцию каротиногенеза, достаточно долгоживущи. Иначе говоря, весь процесс фотоиндукции обладает какой-то «памятью». Об этом свидетельствуют такие эксперименты. Даже после интенсивного освещения мицелия *Fusarium* в аэробных условиях индуцированное образование каротиноидов в темноте полностью прекращается, если объект затем перенести в анаэробную среду. И наоборот, синтез пигментов возобновляется без новой подсветки, если аэробные условия восстановлены. Продолжительность «анаэробного» интервала в некоторых опытах Рау достигала даже 48 ч.

Методом меченых атомов Хардинг с сотр. определил последовательность превращений в цепи биосинтеза каротиноидов у *Neurospora*. В целом их схема является незначительной модификацией общей схемы биосинтеза каротиноидов по Портеру и Андерсону:



В противоположность *Fusarium aquaeductum* у нейроспоры, как полагает Хардинг с сотр., ключевой участок цепи в индукции биосинтеза один. Он располагается между фитонином и фитофлюином. При этом свет снимает частичную темновую репрессию синтеза фитиндегидрогеназы благодаря сенсibiliзирова́нному окислительно-восстановительному повреждению репрессора этого фермента.

Свет не только индуцирует синтез каротиноидов, но и вызывает превращения одних форм каротиноидов в другие. Предполагается следующий путь превращения β -каротина в ксантофиллы:



Участок цепи обратимых химических превращений между виолаксантином и зеаксантином получил название виолаксантинового, или антероксантинового, цикла.

Реакция слева направо в цикле — *дезэпоксидация*, т. е. удаление эпоксидного кислорода, а в обратном направлении — *эпоксидация*. Реакция дезэпоксидации индуцируется светом и имеет спектр действия с максимумами при 480 и 648 нм.

Д. И. Сапожниковым с сотр. показано, однако, что дезэпоксидация может происходить и в аэробных условиях, но по другому механизму, чем при анаэробии: фотоокисление эпоксидной группы или фотовосстановление ее с образованием воды. Биологически активный свет, по-видимому, поглощается как каротиноидами, так и хлорофиллом, а направление реакции в цикле зависит от внутриклеточного газового состава. Кроме того, высказывается предположение, что виолаксантиновый цикл принимает участие в реакциях образования молекулярного кислорода при фотоокислении воды.

3. АНТОЦИАНЫ

Растущие в темноте, этиолированные растения не образуют антоцианов до тех пор, пока они не будут освещены. Так, например, в проростках горчицы под действием света синтезируется пять различных антоцианов. Каждый из них содержит компонент красного цвета — цианидин. Начало синтеза и окончание подсветки разделены более или менее продолжительной лаг-фазой, достигающей у некоторых растений нескольких часов. Не исключено, что роль света здесь, как и в случае каротиноидов, сводится к индукции синтеза ферментативного аппарата биосинтеза антоцианов.

Наиболее хорошо этот процесс изучен у проростков горчицы, в спектрах действия антоцианообразования которых проявляются два максимума: 725 и 440—480 нм. Первый из них приписывается *фитохрому*, поскольку в индукции синтеза антоцианов отчетливо проявляется антагонизм К- и ДК-света. Природа второго максимума пока не ясна. По данным Мора с сотр., для проростков горчицы характерна полная обратимость, т. е. инициация образования пигментов при освещении дальним красным (725 нм) и снятие эффекта при повторном облучении красным светом (670 нм) наблюдаются в первые 5 мин лаг-фазы. Этот факт очень примечательный и означает, что активная форма фитохрома очень быстро включается в события, причастные к индукции синтеза пигментов.

Обнаружено также, что в течение, по крайней мере, 20 ч после окончания лаг-фазы накопление антоцианов со временем протекает линейно, а скорость накопления определяется интенсивностью стимулирующего света. Иными словами, скорость синтеза пигментов зависит от количества активной формы фитохрома. Продолжительность лаг-фазы, представляющая собой специфическую характеристику растения данного вида, составляет около 3 ч и не зависит от дозы облучения. Достаточно вспомнить, что для других фотобиологических процессов, имеющих лаг-фазу, ее продолжительность, как правило, зависит от дозы облучения. К сожалению, это явление еще не получило своего объяснения.

Интересно, что такое распространенное среди син-

тезирующих антоцианы растений явление, как фитохромный парадокс (отсутствие корреляции между спектрофотометрически регистрируемыми продуктами фитохрома и степенью или выраженностью биологического ответа), горчице не свойственно.

У других видов растений отмечаются максимумы в спектрах действия при 450, 690 или при 450, 620, 725 нм с миграцией энергии между хромофорами, поглощающими при 620 и 725 нм. Как правило, для инициирования реакции в синей области необходимы большие дозы, чем в К- и ДК-областях. Можно думать, что фотоконтроль биосинтеза в этом случае осуществляется в основном высокоэнергетической реакцией (см. гл. IX).

В противоположность растениям у водорослей *Spirodella oligorrhiza* в спектрах действия антоцианообразования наряду с максимумом в ДК-области представлен белковый максимум при 280—300 нм, причем постулируется прямое влияние света на синтез.

4. ФАКТОРЫ, СТИМУЛИРУЮЩИЕ РАЗМНОЖЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

К настоящему времени известно значительное количество нефотосинтезирующих микроорганизмов (бактерии, низшие грибы, дрожжи), рост биомассы и митотическая активность которых стимулируется видимым светом. В одних случаях подобная стимуляция связана скорее всего с прямой активацией светом работы энергую-генерирующей электронно-транспортной системы митохондрий, как это имело место в опытах С. В. Колева и Т. И. Лысковой, выполненных на дрожжевых микроорганизмах *Candida utilis*. В пользу этого говорят форма спектров действия стимуляции, близкая к спектрам поглощения НАД, и зависимость величины фотоэффекта от содержания НАД и природы питательного субстрата среды: при выращивании дрожжей на сукцинате натрия, донирующего электроны в электронно-транспортную цепь в обход НАД-содержащих ферментов, стимуляция резко уменьшалась. В других — можно говорить о фотобиосинтезе стимулирующих размножение микроорганизмов веществ (факторов).

В этой связи остановимся на опытах Л. Б. Рубина, выполненных на дрожжеподобных микроорганизмах *Candida guilliermondii*. Спектр действия стимуляции размножения культур кратковременным освещением имел максимумы при 400—440, 540, 580 и 640 нм, причем зависимость фотоэффекта от длительности и интенсивности светового импульса для всех максимумов была одинаковой. Это указывает на существование одного типа биологически активных хромофоров, инициирующих стимулирующее действие. Спектрально-абсорбционный и спектрально-люминесцентный анализ различных фракций клеточного материала позволил предположить порфириновую природу хромофора.

Согласно данным Л. Б. Рубина, поглощение света порфириновым хромофором приводит к синтезу фотоиндуцированного фактора с огромным квантовым выходом. Фактор выделялся в среду, причем супернатанты гомогенатов освещенных культур обладали фотомиметическим действием. Фракционирование материала, представленного в супернатанте, на сефадексе и ионообменных смолах, позволило охарактеризовать фактор как низкомолекулярное ($M < 700$) электрически нейтральное соединение.

Опыты с использованием ингибиторов синтеза РНК показали, что образование фактора, происходящее даже при температуре -15°C , не связано с активацией синтеза белка.

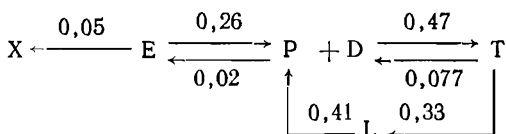
В целом можно представить себе следующий наиболее вероятный механизм стимуляции светом биосинтеза РНК, белков и размножения клеток *Candida guilliermondii*: хромофор + свет $\rightarrow$ конформационная активация мембранных ферментов $\rightarrow$ синтез фактора $\rightarrow$ стимуляция макромолекулярного биосинтеза и деления клеток.

5. ВИТАМИН D

Конечные стадии биосинтеза витаминов группы D имеют фотохимическую природу. Фотохимическая реакция превращения провитамина в витамин не требует белкового носителя и успешно протекает в растворе. Провитамин витамина D₂ является эргокальциферол,

D₃ (у животных) — холекальциферол, а D₄ — 2,2-дигидроэргостерол.

Предложенная ранее общая схема превращения провитамина в витамин D₂: эргостерол (E) → люмистерол (L) → тахистерол (T) → презергокальциферол (P) → эргокальциферол (D) уточнена Раппольдтом с сотр. Ниже приводится их схема, отражающая взаимопревращения форм витамина D₂ при облучении светом с длиной волны 254 нм (числа над стрелками показывают квантовые выходы отдельных фотохимических реакций, X — предшественник неидентифицированной природы):



В темноте между стереоизомерами презергокальциферолом (P) и эргокальциферолом (D) устанавливается термодинамическое равновесие. Из схемы видно, что облучение любого (E, T, L, P) из предшественников приводит в конечном счете к образованию эргокальциферола (витамина D₂). При этом в ходе облучения между концентрациями продуктов устанавливается фотостационарное состояние.

Фотофизика и фотохимия конечных стадий синтеза эргокальциферола (витамина D₂) не изучена. Предполагается только, что фотопревращения идут через синглетные возбужденные состояния, но убедительных доказательств этому нет.

Сущность фотохимической реакции сводится к фотораспаду (разрыв ковалентной C—C-связи в бензольном кольце между атомами углерода в девятом и десятом положениях) у эргостерола и люмистерола или *транс-цис*-фотостереоизомеризации у тахистерола относительно двойной связи 6—7.

Спектры действия образования витамина D₃ в коже животных несколько отличаются от таковых в растворе. Хотя в спектрах поглощения предшественников интенсивность поглощения в максимумах в области 280 нм примерно в два раза больше, чем в области 297 нм, по данным различных авторов, фотохимическая эффектив-

ность света с длиной волны 297 нм либо более высока, либо эффективность света обеих длин волн одинакова.

Такое отличие спектров действия образования витамина D от спектров поглощения предшественников связано скорее всего с экранирующим эффектом «белкового фильтра» рогового слоя кожи. Возможно, это отчасти обусловлено фотосенсибилизацией реакции белком, расположенным в глубоких слоях кожи (*Stratum granulosum*) и поглощающим основную часть доходящего до него длинноволнового компонента света.

Рекомендуемая литература

Годнев Т. Н. Хлорофилл. Его строение и образование в растении. Минск, 1963.

Литвин Ф. Ф., Беляева О. Б. Характеристика отдельных реакций и общая схема биосинтеза нативных форм хлорофилла в этиолированных листьях.— Биохимия, 1971, 36, 615.

Рубин Л. Б. О регуляторном действии света на метаболизм микроорганизмов. Автореф. докт. дис. М., 1973.

Хлорофилл. Минск, 1974.

Шлык А. А. Метаболизм хлорофилла в зеленом растении. Минск, 1964.

Шлык А. А. Развитие исследований метаболической гетерогенности фотосинтетических мембран. Итоги первого этапа.— В сб.: Биосинтез и состояние хлорофиллов в растении. Минск, 1975, с. 104.

Harding R., Huang P., Mitchell H. Photochemical studies of the carotenoid biosynthetic pathway in *Neurospora crassa*.— Arch. Biochem. Biophys., 1969, 129, 696.

Havinga E., Kock R. de, Rappoldt M. The photochemical interconversion of provitamin D, lumisterol and tachisterol.— Tetrahedron, 1960, 11, 276.

Lusa H. F. de. Vitamin D: the vitamin and the hormone.— Feder. Proc., 1974, 33, 2211.

Rau W. Untersuchungen über die lichtabhängige Karotinoid-synthese. IV. Die Rolle des Sauerstoffs bei der Lichtinduction.— Planta, 1969, 84, 30.

Rilling H. Mechanism of photoinduction of carotenoid synthesis.— Biochim. et biophys. acta, 1964, 79, 464.

Vince D. Photomorphogenesis in plant stems.— Biol. Rev., 1964, 39, 506.

Zalokar M. Biosynthesis of carotenoid in *Neurospora*. Action spectrum of photoconversion.— Arch. Biochem. Biophys., 1955, 56, 318.

Глава XII. ДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО СВЕТА НА НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

1. ПРИРОДА И ХАРАКТЕРИСТИКА ЭЛЕКТРОННО-ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ ПУРИНОВЫХ И ПИРИМИДИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ

Основными хромофорами нуклеиновых кислот являются пуриновые (*аденин* и *гуанин*) и пиримидиновые (*цитозин* и *тимин* у ДНК, *цитозин* и *урацил* у РНК) азотистые основания нуклеотидов. Все эти соединения, как и соответствующие нуклеозиды и нуклеотиды, обнаруживают длинноволновую границу поглощения при $\lambda=300$ нм. За поглощение света ответственна в основном π -электронная система колец ($\pi-\pi^*$ -переходы). Полосы поглощения оснований (максимум около 260 нм), сформированные $\pi-\pi^*$ -переходами, характеризуются высокой молярной экстинкцией. Некоторый вклад в общее поглощение, особенно в длинноволновой части спектра, вносят $n-\pi^*$ -переходы с участием неподеленной пары электронов гетероатомов азота и кислорода. Участие $n-\pi^*$ -переходов наиболее существенно в малополярных растворителях и проявляется в спектрах поглощения в виде «плеч» в области 280—320 нм. Выраженное влияние на положение максимума спектра поглощения оснований и прежде всего на относительную энергию $\pi-\pi^*$ - и $n-\pi^*$ -переходов оказывают заместители в пуриновом и пиримидиновом кольцах. Наибольший эффект при этом вызывают заместители при углеродном атоме во втором и четвертом положении у пиримидинов и втором и шестом положении у пуринов.

Положение спектров поглощения оснований сильно зависит от рН раствора из-за образования различных ионных форм и в меньшей степени от полярности растворителя вследствие межмолекулярных взаимодействий. Спектры поглощения нуклеиновых кислот формируются из спектров поглощения входящих в их состав оснований и имеют «усредненную» длинноволновую полосу поглощения с максимумом, расположенным в интервале 255—270 нм (в зависимости от нуклеотидного состава). Однако спектры поглощения нуклеино-

вых кислот и эквивалентной смеси нуклеотидов полностью не совпадают. Отклонение от аддитивности обусловлено дисперсионными взаимодействиями между упорядоченно расположенными основаниями вдоль двойной спирали («стопка»). Так, гидролиз ДНК до свободных нуклеотидов сопровождается сдвигом полосы поглощения с 258 до 267 нм с одновременным увеличением экстинкции на 70%. При денатурации ДНК эти изменения выражены в меньшей степени: величина гиперхромного эффекта составляет 40%.

Итак, взаимодействие ультрафиолетового света с нуклеиновыми кислотами приводит к возникновению электронно-возбужденных состояний различных оснований. При этом нижнее синглетное возбужденное состояние оснований возникает в основном в результате $\pi - \pi^*$ -перехода, хотя в ряде случаев оно может быть следствием $n - \pi^*$ -перехода. Триpletное состояние нуклеотидов, как правило, возникает при $\pi - \pi^*$ -переходе. Нуклеиновые кислоты (а также основания, нуклеозиды, нуклеотиды) при комнатных температурах и нейтральных рН практически не люминесцируют.

При физиологических условиях флуоресценция аденина, гуанина, цитозина, тимина, а также ДНК имеет крайне низкие квантовые выходы (около 10^{-4}) и время жизни ($\tau \approx 10^{-12}$ с) (табл. 11). Выраженная люминесценция нуклеиновых кислот и оснований наблюдается только при экстремальных значениях рН, а также при низких температурах.

2. МИГРАЦИЯ ЭНЕРГИИ

Отсутствие флуоресценции при физиологических условиях, как уже указывалось, означает, что у всех оснований время жизни синглетного возбужденного состояния очень небольшое, что исключает возможность эффективной миграции энергии по индуктивно-резонансному механизму (несоблюдение первого правила Ферстера).

Теоретически возможна, хотя экспериментально не доказана, индуктивно-резонансная миграция энергии только в афизиологических условиях — при температу-

Таблица 11. Параметры флуоресценции и фосфоресценции нуклеотидов при 77 К

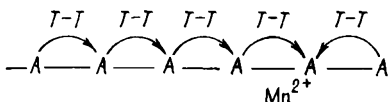
Основание	Флуоресценция			Фосфоресценция	
	квантовый выход	$\tau_{\text{изм, нс}}$	$\tau_{\text{ест, нс}}$	квантовый выход	$\tau, \text{с}$
Аденин	0,01	2,8	3,0	—	—
Гуанин	0,13	5,0	12,0	0,07	1,3
Цитозин	0,05	—	—	0,03	0,34
Тимин	0,16	3,2	4,5	0,01	0,5
Урацил	0,01	—	4,5	—	—

ре 77 К или ниже. До сих пор однозначно не решен и вопрос о зонной полупроводимости нуклеиновых кислот. Исследования температурных зависимостей проводимости свидетельствуют о том, что нуклеиновые кислоты скорее всего являются диэлектриками, чем полупроводниками. К тому же эти результаты были получены на сухих таблетках нуклеиновых кислот и вряд ли могут быть перенесены на растворы, поскольку обезвоживание сильно искажает вторичную и третичную структуры ДНК. Столь же неоднозначны и данные по фотопроводимости. Нет также прямых данных, свидетельствующих в пользу протекания миграции энергии между основаниями по механизму синглетного экситона. Наблюдаемые синий сдвиг спектра поглощения и красный сдвиг спектра флуоресценции у полиадениловой кислоты, по сравнению со спектрами мономера (аденина), по-видимому, не связаны с экситоном, а объясняются изменением вероятности $\pi - \pi^*$ - и $n - \pi^*$ -переходов при интенсивных межмолекулярных взаимодействиях. Кроме того, низкотемпературная флуоресценция полимера не обнаруживает заметной деполяризации. Все эти факты указывают на отсутствие межадениновой миграции энергии в ДНК.

Более вероятна миграция энергии с участием триплетных уровней оснований. Согласно фосфоресцентным измерениям, энергия триплетных состояний мононуклеотидов убывает в ряду цитозин > гуанин > аденин > тимин.

Уже это позволяет предполагать, что при благоприятных условиях миграция энергии между нуклеотидами в ДНК может протекать в направлении от цитозина к тимину.

Существуют и прямые доказательства того, что при низких температурах (77 К) энергия электронного возбуждения может мигрировать по основаниям вдоль полинуклеотидной цепи. Этот межнуклеотидный перенос энергии представляет, по-видимому, *триплет-триплетный экситон*, о чем говорят следующие факты. В аденин-цитозиновом динуклеотиде в отличие от смеси мононуклеотидов обнаружены сенсibilизированные цитозином фосфоресценция и сигнал ЭПР аденина. В двуспиральном сополимере адениловой и тимидиловой кислот свет, поглощенный аденином, вызывает фосфоресценцию тимина. Обнаружено также, что всего один парамагнитный (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+}) ион, связывающийся с одним основанием в ДНК или полиадениловой кислоте, мало влияя на интенсивность флуоресценции, тушит фосфоресценцию не одного, а многих (десяти) оснований:



Нуклеотид, находящийся в комплексе с ионом, можно рассматривать, следовательно, как ловушку, в которую попадает делокализованная по цепи нуклеотидов энергия возбуждения, где она и диссипирует в тепло.

Теоретическая обработка результатов по тушению фосфоресценции и ее временам жизни ($\tau_{\text{фосф}}$), а также данные ЭПР показали, что за время жизни триплетного состояния нуклеотидов в полиадениловой кислоте (2,4 с) энергия возбуждения делокализуется в пределах 100 оснований. Сходную информацию дают проведенные Галли опыты с комплексами ДНК — акридиновый краситель. Исследовалась зависимость интенсивности замедленной флуоресценции (альфа-фосфоресценции) акридинового оранжевого от интенсивности возбуждающего света, адресуемого не красителю, а основаниям. Оказалось, что при увеличении интенсивности возбуж-

дающего света интенсивность замедленной флуоресценции красителя возрастает параллельно с интенсивностью фосфоресценции оснований, отражающей концентрацию их триплетных состояний. По мере увеличения числа молекул красителя, приходящихся на полинуклеотид, сокращалось время жизни замедленной флуоресценции. Эти данные свидетельствуют о том, что энергия электронного возбуждения мигрирует сначала по триплетным уровням оснований до «столкновения» с ближайшим комплексом основание — краситель, а затем после триплет-синглетного переноса на краситель высвобождается в виде замедленной флуоресценции.

Чрезвычайно важно, что в ряде работ Галли обнаружена делокализация энергии возбуждения между основаниями ДНК при комнатной температуре, хотя вопрос о механизмах этой миграции энергии еще далеко не решен. Из данных Вайля и Галли следует, что флуоресценция красителей, комплексированных с ДНК, снабжается энергией, поглощаемой не одним, а 10—20 или 25—30 основаниями.

«Откачка» энергии на краситель сопровождается одновременной защитой ДНК от фотоповреждений. Г. Б. Завильгельский с сотр. проследил влияние красителей акридинового ряда (атебрин, акридиновый оранжевый, профлавин) на фоточувствительность инфекционных ДНК к летальному действию ультрафиолетового света и показал, что максимальной защитной эффективностью обладает атебрин, ингибирующий около 96% летальных повреждений.

В связи с тем, что участие синглетного и триплетного возбужденных состояний в фотохимических реакциях полинуклеотидов определяется тремя факторами (природой основания, поглотившего квант света, типом фотохимического превращения и условиями, в которых оно протекает), мы будем обсуждать вопрос о роли синглетных и триплетных уровней для каждого конкретного случая в отдельности.

3. ТИПЫ ФОТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

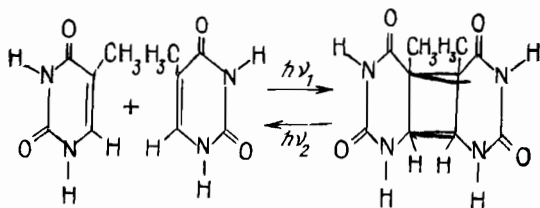
Прежде всего необходимо подчеркнуть, что пуриновые основания приблизительно на порядок более фоторезистентны, чем пиримидиновые. Поэтому нуклеино-

вые кислоты повреждаются в основном через *фотохимию пиримидиновых оснований*. К настоящему времени выявлено несколько типов фотохимических реакций, ведущих к различным повреждениям ДНК: образование димеров тимина, урацила, цитозина, цитозин-тимина, тимин-урацила; гидратация цитозина и урацила; внутримолекулярные и межмолекулярные сшивки ДНК; сшивки ДНК — белок; разрывы сахаро-фосфатного остова нуклеиновых кислот.

4. ДИМЕРИЗАЦИЯ ТИМИНА

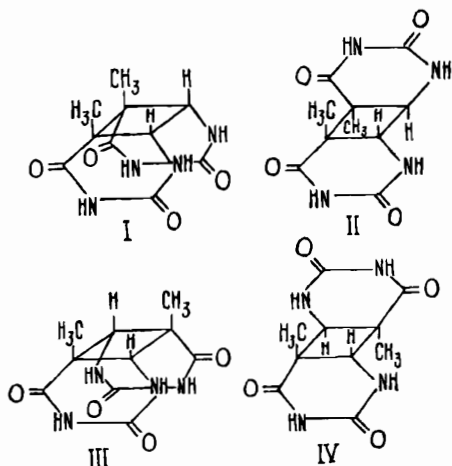
В 1958 г. Бьюжерс, Йильстра и Берендс обнаружили, что при ультрафиолетовом облучении замороженных водных растворов тимина образуется фотопродукт, который позднее хроматографически был выделен в чистом виде и по молекулярному весу, элементарному составу, кристаллографическим, ИК-спектроскопическим свойствам и растворимости идентифицирован как циклобутановый димер. Аналогичные димеры образуются в одонитевых полинуклеотидах и ДНК.

Смысл реакции фотодимеризации заключается в разрыве 5,6-двойной связи у обоих партнеров и образовании циклобутанового кольца:



Как прямая, так и обратная реакции имеют чисто фотохимическую природу и не требуют термической активации: в замороженных растворах тимина в интервале от 0 до -196°C скорость реакций не изменяется, т. е. $Q_{10}=1$, $E_{\text{акт}}=0$.

Из облученных модельных соединений, например тимидил-тимидина, с помощью тонкослойной хроматографии выделены четыре типа димеров с циклобутановым кольцом — два *цис*- и два *транс*-изомера:



Однако при облучении ДНК обнаруживается лишь один *цис*-димер типа I. Под действием коротковолнового света (например, $\lambda = 235$ нм) димеры моно-

меризуются. Поскольку спектры поглощения димеров и мономеров, перекрываясь, сильно различаются между собой (рис. 45), при длительном облучении для каждой волны возбуждающего света в спектральном интервале перекрытия устанавливается динамическое равновесие, при котором скорость прямой равна скорости обратной реакции. Так, известно, что для $\lambda = 285$ нм отношение экстинкций димер/мономер в 1000 раз меньше, чем

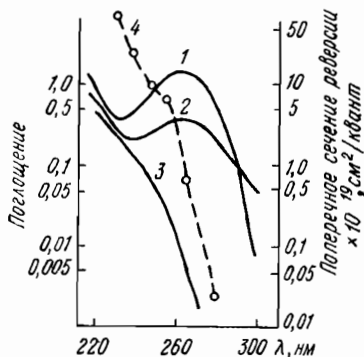
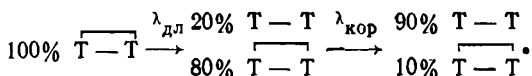


Рис. 45. Спектры поглощения тимина (1), облученного тимина (2), тиминового димера (3) и спектр действия реверсии димер→мономер (4) (Setlow R., 1961)

для $\lambda = 235$ нм. Поэтому применение «насыщающего» облучения 239 нм после 290 нм, как показали Сетлоу и Ка-

риэ, резко уменьшает концентрацию димеров в ДНК и политимидиловой кислоте. Изменение стационарного равновесия между димерной и мономерной формами в политимидиловой кислоте при переходе от длинноволнового к коротковолновому облучению иллюстрируется следующей схемой:



Спектры действия образования и разрушения димеров в политимидиловой кислоте, как и следовало ожидать, близки по форме к соответствующим спектрам поглощения, хотя и имеют некоторые различия, о которых мы будем говорить ниже.

Вследствие бимолекулярного характера реакции фотодимеризации ее квантовый выход сильно зависит от концентрации и степени взаимориентации мономеров в момент возбуждения одного из них. При идеальном стереометрическом соответствии мономеров (кристаллы моногидратов тимина) квантовый выход прямой реакции равняется 1. По мере нарушения этого соответствия квантовый выход реакции уменьшается для политимидиловой кислоты до 0,02, для дитимидиловой до 0,01, для тимидил-тимидина до 0,003. Именно вследствие более благоприятной ориентации нуклеотидов димерообразование в политимидиловой кислоте при 77 К протекает в 5 раз быстрее, чем при 298 К. Процесс, однако, быстро прекращается и только после переориентации мономерных звеньев при замораживании — оттаивании образца идет дальше. Ориентационными нарушениями объясняется и резкое падение выхода димеров при температуре плавления нативной ДНК, которое не наблюдается у предварительно денатурированной ДНК.

Число образующихся в ДНК димеров тимина определяется количеством расположенных рядом тимино-вых остатков. По данным Корнберга с сотр., в ДНК *M. lysodeicticus* в такие пары включено около 1,8, а в ДНК фага T2—11% всего тимина. В соответствии с

этим в ДНК *M. lysodeicticus* димеризуется 1,2, а в ДНК фага Т2 — 5,7% всего тимина.

Вероятность образования димеров зависит также от вторичной и третичной структур ДНК. Подтверждением этому служат опыты Г. Б. Завильгельского и сотр., в которых была выявлена отчетливая корреляция между квантовым выходом димеризации тимидил-тимидина и взаимоориентацией тимина, а также выходом образования летальных димеров в инфекционной фаговой ДНК и конформацией макромолекулы, контролируемой температурой и денатурирующими веществами. По расчетам японского исследователя Нагата, условия для димеризации наиболее благоприятны у тех конформаций ДНК (из всех возможных), у которых соседние остатки тимина ориентированы друг к другу под углом 36° .

Перейдем теперь к рассмотрению имеющихся данных по фотофизике процесса. Известны убедительные экспериментальные доказательства того, что предшественник фотодимеров тимина — *первое триплетное состояние основания*: 1) триплетные тушители (O_2 , парамагнитные ионы) тормозят фотодимеризацию тимина; 2) к тому же результату приводит уменьшение заселенности триплетных уровней тимина (тест — тушение фосфоресценции) при триплет-синглетной миграции энергии с тимина ДНК на краситель профлавин; 3) димеры образуются в разбавленных растворах тимина, где временные промежутки между столкновениями значительно превышают время жизни их возбужденных синглетных состояний (10^{-12} с), но соизмеримы с временем жизни триплетов (10^{-6} с); 4) избирательное заселение триплетных уровней при триплет-триплетной миграции энергии от ацетофенона к тимину ДНК в растворе, а также в интактных фагах Т4 приводит к образованию димеров.

Однако на основании опытов по ингибированию димерообразования в ДНК хлороквином, сопоставления спектральных зависимостей эффективности торможения димерообразования в ДНК этидиумбромидом (акцептор энергии) и квантовых выходов его сенсibilизированной основаниями флуоресценции Сазерлендом было высказано предположение о том, что часть димеров образуется «синглетным» путем.

Все же к настоящему времени наиболее аргументирована точка зрения о преимущественно «триплетном» образовании димеров в ДНК при физиологических условиях. Отмеченное Сазерлендом некоторое несовпадение спектра действия димеризации со спектром поглощения тимина, заключающееся в возрастании квантового выхода фотохимической реакции с уменьшением длины волны света, может быть объяснено более эффективным заселением триплетных уровней тимина с высоких колебательных подуровней синглетного возбужденного состояния. Это хорошо согласуется с аналогичной зависимостью от длины волны облучения константы скорости интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние, полученной методом флеш-фотолиза.

В работах Айзингера с сотр. методом ЭПР было показано, что при ультрафиолетовом облучении в ДНК возникают свободные радикалы тимина. Однако ингибиторы свободнорадикальных реакций не оказывали существенного влияния на процесс фотодимеризации. По всей видимости, роль свободнорадикальных состояний в образовании димеров тимина невелика и предшественником димера является все же не свободный радикал тимина, а его триплетное состояние. Можно думать в связи с этим, что сигнал ЭПР регистрируется скорее всего от тех тиминовых оснований, для димеризации которых нет стерических условий.

Есть все основания думать, что димеры образуются непосредственно из триплетного эксимера. Минувя стадию лабильного химического фотопродукта, эксимер, по-видимому, прямо превращается в стабильный фотохимический продукт — димер.

Как отмечалось выше, замыкание двух ковалентных C—C-связей между двумя молекулами тимина происходит в *пятом* и *шестом* положениях. Действительно, квантовомеханические расчеты показывают, что именно между пятым и шестым углеродными атомами в первом возбужденном состоянии наиболее высокая концентрация неспаренных электронов (спиновая плотность). При этом значительно уменьшается и подвижный порядок связи 5—6: двойная связь приближается к одинарной. Это способствует ее «разрыву» и замыканию меж-

тиминовых связей благодаря «электронным вакансиям» (высокой спиновой плотности). По данным Пюльмана, способность различных пиримидинов к димеризации удовлетворительно коррелирует с рассчитанными для них квантовомеханическими характеристиками. С помощью приближенного метода расчета (самосогласованное поле) В. И. Данилов пришел к выводу, что наилучшие условия для димеризации создаются в триплетном, а не в синглетном состоянии. Это хорошо согласуется с приведенными выше экспериментальными данными.

Итак, большинство экспериментальных данных свидетельствует о триплетном механизме образования тиминовых фотодимеров. Тем не менее вероятность проте-

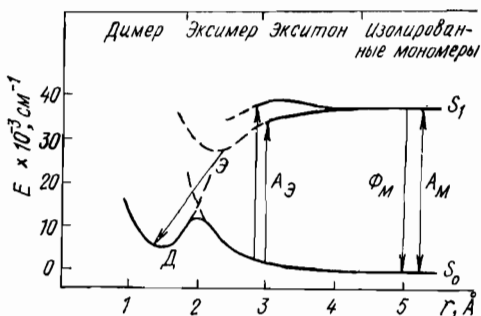


Рис. 46. Кривые потенциальной энергии взаимодействия между молекулами тимина (Lamola A., 1968)

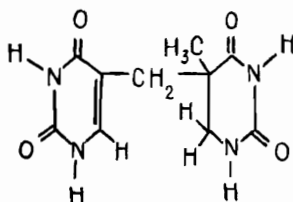
кания реакции фотодимеризации через синглетное состояние, особенно при благоприятных физических и физико-химических условиях, остается достаточно высокой.

По мнению Ламолы, характер взаимодействия между двумя молекулами тимина при условии оптимального стерического соответствия зависит от расстояния между партнерами (рис. 46). При расстоянии 3—4,5 Å наблюдается экситонное взаимодействие с заселением обоих уровней экситонного состояния. Если молекулы сближаются еще больше ($\sim 2,8$ Å), из нижнего экс-

тонного состояния возникают эксимеры, которые переходят прямо в димер.

5. ДИМЕРИЗАЦИЯ ТИМИНА В ОБЕЗВОЖЕННЫХ ПЛЕНКАХ И СПОРАХ

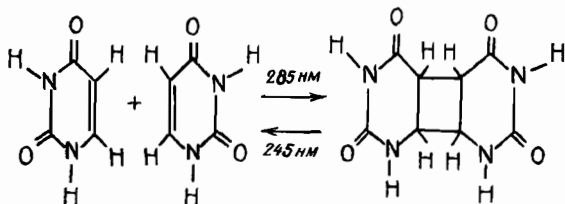
При облучении твердых пленок тимидина, а также спор бактерий, обладающих повышенной резистентностью, образуется нециклобутановый димер — 5-тиминил-5,6-дигидротимин



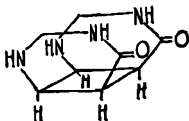
Образованию этого продукта в спорах способствует, по-видимому, особая конформация ДНК, характерная для спор.

6. ДИМЕРИЗАЦИЯ УРАЦИЛА

Фотодимеры урацила с циклобутановым кольцом выделены и идентифицированы при УФ-облучении урацила или его производных в замороженных и водных растворах урацилсодержащих динуклеотидов, полиуридиновой кислоты, РНК вируса табачной мозаики, транспортная и рибосомальная РНК:



Из четырех теоретически предсказанных стереоизомеров урацила при облучении образуется в основном *цис*-изомер типа

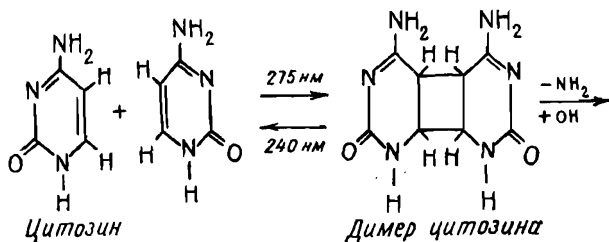


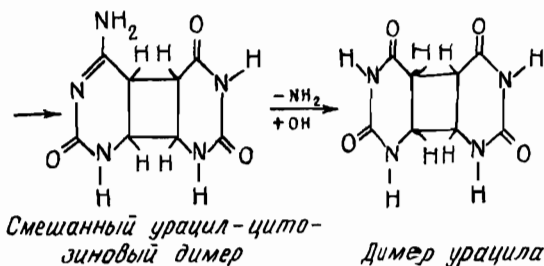
Как и в случае тимина, димеризация урацила фотообратима. Квантовые выходы прямой и обратной реакций зависят от длины волны света. Их максимальные значения для полиурациловой кислоты составляют 0,1 ($\lambda=248$ нм) и 0,45 ($\lambda=230$ нм) соответственно. Скорость *бимолекулярной*, но *одноквантовой* реакции фотодимеризации урацила обнаруживает явно выраженную зависимость от его концентрации в растворе, возрастающая в 2 раза для уридил-2'-(3')-фосфата при переходе от 10^{-4} до 10^{-2} моль/л. По-видимому, фотодимеризация урацила, как и тимина, протекает через его *триплетное* состояние, на что указывает уменьшение скорости димеризации в присутствии триплетных тушителей и ее увеличение при избирательном заселении триплетных уровней с помощью сенсibilизаторов.

На основании данных по тушению Браун и Джонс оценили время жизни триплетного состояния урацила в $2 \cdot 10^{-5}$, а Шетлар — в 10^{-7} с.

7. ДИМЕРИЗАЦИЯ ЦИТОЗИНА

Фотодимеризация цитозина обнаружена при УФ-облучении цитозина, цитидил-цитидина, полиуридилцитидиловой кислоты и ДНК:

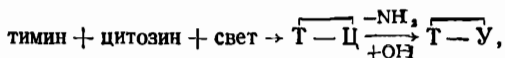




Квантовый выход димеризации возрастает в 9 раз при увеличении рН от 3,0 до 6,5. Фотодимеры цитозина под действием коротковолновых лучей мономеризуются. Димеры цитозина неустойчивы и в темноте могут мономеризоваться или дезаминироваться, превращаясь в урациловые димеры. Вследствие высокой лабильности цитозиновых димеров их пространственную структуру установить до сих пор не удалось.

8. СМЕШАННАЯ ДИМЕРИЗАЦИЯ ОСНОВАНИЙ

При облучении растворов нуклеотидов и ДНК образуются смешанные тимин-цитозиновый, тимин-урациловый и урацил-цитозиновый димеры. Смешанный тимин-цитозиновый димер практически не мономеризуется под действием света и представляет собой *транс*-изомер. На первый взгляд кажется странным образование в ДНК тимин-урацилового димера, поскольку известно, что урацил не входит в состав ДНК. Это противоречие объясняется следующей схемой:

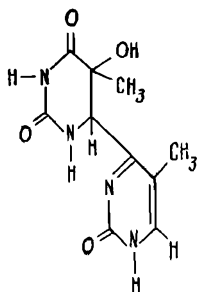


т. е. темновым дезаминированием цитозина до урацила в составе смешанного димера.

9. ПИРИМИДИНОВЫЕ АДДУКТЫ

Кроме циклобутановых пиримидиновых димеров при УФ-облучении нуклеотидов могут образовываться раз-

личные гомо- и гетеродимеры, получившие название пиримидиновых аддуктов. При этом, например, из двух тиминовых оснований образуется нециклическая димерная структура

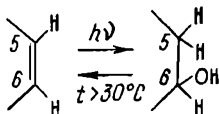


характеризующаяся иными, чем у тимина, спектральными свойствами: полоса поглощения аддукта сдвинута в длинноволновую сторону примерно на 40 нм.

По сравнению с пиримидиновыми димерами количество аддуктов, возникающих при УФ-облучении, невелико. Аддукты возникают, по-видимому, не через триплетное, а через синглетное состояние, так как добавление доноров триплетного состояния тимина не сенсibiliзирует их образование.

10. ГИДРАТАЦИЯ УРАЦИЛА И ЦИТОЗИНА

Реакция фотогидратации сводится к присоединению воды к пиримидиновому кольцу у 5,6-двойной связи с ее последующим разрывом:



Фотогидраты образуются в растворах урацила и цитозина, их ди- и полинуклеотидах (нуклеозидах), РНК и ДНК. Характерно, что пиримидиновые гидраты эффективно образуются в одно-, но не двухтяжевой ДНК. Ско-

рость фотогидратации уменьшается при замене H_2O на D_2O . Реакция гидратации фотонезобратима. Поэтому при длительном или интенсивном ультрафиолетовом облучении (240—270 нм) полиуридиловой кислоты практически обнаруживаются только гидраты.

В отличие от димеров гидраты разрушаются в темноте при повышенных температурах, при сдвигах pH как в щелочную, так и в кислую сторону, при повышении ионной силы раствора. Квантовый выход фотогидратации урацила в растворе 0,002, в полиуридиловой кислоте 0,01. Есть все основания считать, что предшественником фотогидратов служат не триплетные, а *синглетные* возбужденные состояния пиримидиновых оснований, поскольку, во-первых, выход фотогидратации не зависит от длины волны света, в то время как вероятность конверсии в триплетное состояние зависит от нее; во-вторых, триплетные тушители, влияя на скорость димеризации, оказываются неэффективными по отношению к гидратации; в-третьих, избирательное заселение триплетных уровней оснований за счет миграции энергии не сопровождается гидратацией.

11. ТАУТОМЕРИЗАЦИЯ ОСНОВАНИЙ

Квантовомеханические расчеты показывают, что благодаря изменениям конфигурации электронного облака оснований в первом возбужденном состоянии и связанному с ними изменению энергии резонанса повышается вероятность образования обычно редких *таутомерных форм оснований* (лактим-лактаминная и аминокиминная таутомерная фототрансформация). Возбуждение способствует сдвигу равновесия в системе к редкой лактимной форме ($\text{R}-\text{C}=\text{O} \rightarrow \text{R}'-\text{C}-\text{OH}$) у гуанина, урацила и тимина и к иминоформе ($\text{R}-\text{NH}_2 \rightarrow \text{R}'=\text{NH}$) у аденина и цитозина, благодаря чему при репликации становится возможной комплементация цитозина не с гуанином, а с аденином и гуанина не с цитозином, а с тиминном. Однако короткие времена жизни возбужденных состояний оснований ($\tau \approx 10^{-12}$ с) делают проблематичным сохранение сдвига равновесия таутомерных форм в течение репликации.

12. РАЗРЫВЫ ПОЛИНУКЛЕОТИДНОЙ ЦЕПИ

Разрывы сахаро-фосфатного остова ДНК (чаще всего только одной нити) наблюдаются лишь при действии больших доз ультрафиолетового излучения с квантовым выходом, по крайней мере, на три порядка меньшим, чем в случае димеризации пиримидинов. Например, квантовый выход разрывов цепи ДНК вируса табачной мозаики $3,5 \cdot 10^{-6}$. В результате разрывов увеличивается вязкость, уменьшается двулучепреломление в потоке и скорость седиментации. Разрывы нитей можно наблюдать под электронным микроскопом.

13. ВНУТРИ- И МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПОПЕРЕЧНЫЕ СШИВКИ В ДНК

О внутримолекулярных ковалентных сшивках между двумя комплементарными нитями ДНК в растворе свидетельствует тот факт, что УФ-облученная ДНК неспособна расплетаться на нити при денатурационных воздействиях — разрыве водородных и других нековалентных связей. Такие «сцепленные» нити выявляются при центрифугировании в градиенте плотности, а также в опытах с использованием ДНК, одна из цепей которых мечена по азоту (N^{15}). Облученные, а затем денатурированные молекулы ДНК устойчивы к действию фосфодиэстеразы, субстратом которой является однонитевая ДНК.

Используя способность акридинового оранжевого в комплексе с двунитевой ДНК флуоресцировать в красной, а в комплексе с однонитевой ДНК — в зеленой области спектра, Г. Б. Завильгельский показал, что время жизни флуоресценции в красной области увеличивается, а в зеленой уменьшается с увеличением дозы (возрастание степени локального расплетения нитей); зависимость тех же параметров от дозы облучения была обратной в опытах, проведенных по схеме облучение — нагревание до 100°C — быстрое охлаждение — измерение (уменьшение степени термической денатурации из-за возрастания числа межнитевых сшивок). Как и сле-

довало ожидать, экспоненциальные кривые время жизни флуоресценции — доза в первом и втором вариантах опытов, начиная с определенных доз, сливались, выходя на плато, так как двунитевые участки ДНК стабилизируются поперечными сшивками и были уже не чувствительными к температуре.

Спектр действия образования поперечных сшивок совпадает со спектром поглощения тимидина, что также подтверждает предположение о димерной ($T-T$) природе поперечных сшивок. Кроме того, показано, что квантовый выход образования сшивок тем выше, чем больше в ДНК содержится аденина и тимина. Как и димеры тимина, сшивки фотореактивируются.

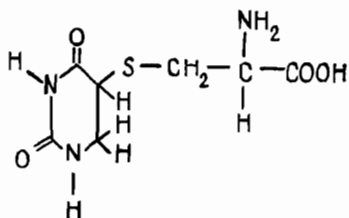
Остается, однако, неясной природа межмолекулярных сшивок, возникающих при УФ-облучении сухих препаратов ДНК и головок сперматозоидов лосося, в которых молекулы ДНК, как известно, плотно упакованы. Выявить такие сшивки при облучении растворов ДНК не удалось. Следовательно, межмолекулярные ДНК — ДНК сшивки эффективно образуются при облучении подсушенных, но не влажных клеток, вирусов и ДНК. Они уменьшают растворимость ДНК и способствуют ее гелеобразованию. Известно, что квантовый выход образования межмолекулярных сшивок составляет 10^{-2} . По мнению Шугара, за образование сшивок ДНК—ДНК ответственны также тиминовые димеры, но, видимо, не циклобутанового типа.

14. СШИВКИ НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА — БЕЛОК

Первым косвенным свидетельством фотохимического образования ковалентных сшивок между ДНК и белком было обнаруженное Смитом ухудшение экстрагируемости ДНК из *E. coli*, подвергнутой УФ-облучению. После обработки лизированных клеток трипсином экстрагируемость ДНК полностью восстанавливалась. В последующих работах Смита образование подобного рода сшивок было воспроизведено *in vitro* в смеси ДНК — бычий сывороточный альбумин.

Акцептором активного света являются оба компонента, поскольку предварительное облучение как белка, так и ДНК перед смешиванием сопровождается возникновением сшивок. На основании этого непосредственными предшественниками сшивок считают не синглетные или триплетные возбужденные состояния хромофоров, а некие *долгоживущие продукты, возможно, свободнорадикальной природы*. Смит обнаружил, что при облучении полирибоуридиловой, полирибоцитидиловой, полидезоксцитидиловой, полидезокситимидиловой кислот, РНК и ДНК с цистеином происходит его химическое комплексообразование с этими полинуклеотидами, и определил константы скоростей соответствующих реакций. Константа скорости взаимодействия цистеина с ДНК равна сумме констант скоростей его взаимодействия с отдельными нуклеотидами.

В связи с этим можно полагать, что в реальных условиях сшивки нуклеиновой кислоты с белком происходят с участием прежде всего цистеина. В 1966 г. Смитом выделен и идентифицирован стабильный продукт взаимодействия урацила и цистина — 5-цистеин-6-гидроурацил.



Однако позднее благодаря работам Джонса и Шетлара стало очевидным, что в модельных условиях кроме цистеина ковалентно присоединяться к урацилу при УФ-облучении могут еще десять аминокислот. В свою очередь высокую реакционную способность при образовании сшивок с аминокислотами проявляет и тимин. Джонс детально изучил образование смешанных фотопродуктов из тимина и цистеина. По его данным, УФ-свет индуцирует образование, по крайней мере, пяти различных фотопродуктов, которые хорошо разделяются и идентифицируются с помощью хроматографии.

Итак, в комплексе ДНК — аминокислота ковалентная связь образуется с участием отдельных оснований и прежде всего тимина и урацила. Смит полагает, что аминокислоты белков через SH- и OH-группы присоединяются к пятому (или шестому) углеродному атому основания.

15. ДЕНАТУРАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Фотоденатурация нуклеиновых кислот является следствием разрушения кооперативной системы слабых нековалентных связей (водородные, гидрофобные и т. д.) и частичного (локального) или полного нарушения двуспиральной структуры Уотсона — Крика (эффект «расплетания»). Наиболее вероятно, что денатурация нуклеиновых кислот представляет собой вторичный темновой процесс, вызванный образованием фотопродуктов, хотя не исключена возможность прямого разрыва слабых связей при тепловой диссипации энергии электронного возбуждения оснований, как это предполагается для белков. Несмотря на то, что спектр действия денатурации ДНК совпадает со спектром поглощения тимидина, причастность тиминовых димеров к образованию денатурированных участков в ДНК остается до сих пор сомнительной. Г. Б. Завильгельским твердо установлено, что локальные нарушения вторичной структуры ДНК при ее облучении коротковолновым светом определяются индукцией сшивок между комплементарными нитями ДНК. Наиболее точно такой вывод подтверждается опытами, в которых миграционным путем с ацетофенона на тимин изменялось количество тиминовых димеров в ДНК. При этом каких-либо различий в кривых плавления, отражающих состояние вторичной структуры, у образцов ДНК, содержащих 0,17 и 30% димеров, обнаружить не удалось. В то же время кинетика образования сшивок и локальных денатурационных участков в ДНК идентична.

Эффект денатурации можно выявить с помощью спектрофотометрических, вискозиметрических, седиментационных измерений, методами дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма, при изучении температур плавления спиралей, связывания формальдегида и красителей.

Чрезвычайно важно, что из-за выраженных кооперативных свойств макромолекул причиной функциональной инактивации могут быть не сами элементарные фотохимические повреждения, а последующие конформационные перестройки, затрагивающие систему слабых связей за пределами повреждения. Так, фотохимические повреждения т-РНК, локализованные вне антикодона, все же приводят к инактивации — нарушению комплементарного связывания антикодона т-РНК с кодоном и-РНК.

Известен и другой факт: фотоповреждения, локализованные в 30 S рибосомальных частицах, не влияют на их прямую функцию, но приводят к инактивации 50 S частиц, в состав которых входят заведомо другие молекулы р-РНК.

16. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Как известно, ультрафиолетовое облучение приводит к блокированию или модификации всех известных функций нуклеиновых кислот. При фотоповреждении ДНК ингибируются трансформирующая активность и способность к репликации и транскрипции, а также происходят различные мутационные изменения, затрагивающие цистроны, кодирующие структуру всех белков, т-РНК и р-РНК. При локализации повреждения в и-РНК ингибируется процесс связывания ее с рибосомами и т-РНК, утрачивается трансляционная активность, искажается матричный смысл. Наконец, при прямом фотоповреждении т-РНК подавляется ее акцепторная активность к аминокислотам, изменяется структура антикодона и способность комплексоваться с рибосомами и кодонами и-РНК. Конечным результатом фотохимических повреждений нуклеиновых кислот являются *гибель* или разнообразные *мутации*, а также всевозможные *физиологические изменения* бактериофагов, клеток и организмов.

Очевидно, что биологическое значение могут иметь только те фотохимические реакции в растворах нуклеиновых кислот, которые приводят к образованию заметных количеств фотопродуктов уже в результате облуче-

ния минимальными биологически активными дозами УФ-света. Биологическую значимость различных фотоповреждений ДНК можно оценить, сравнивая данные, приведенные в табл. 12 и 13, составленных Сетлоу.

Если поперечное сечение (или вероятность) биологического эффекта намного больше поперечного сечения образования фотопродукта, то данный фотопродукт не играет существенной роли в конечном биологическом макроэффекте. Исходя из этих соображений, можно утверждать, что биологическая роль разрывов рибозофосфатного остова и поперечных сшивок ДНК сомнительна (см. табл. 12). Все остальные рассмотренные фотопродукты образуются в заметных количествах при облучении клеток биологически активными дозами (например, D_{37}) УФ-лучей и принимают то или иное участие в различных биологических эффектах.

Таблица 12. Фотоповреждения ДНК

Виды повреждения	Доза облучения, достаточная для одного повреждения, Дж/м ² ($\lambda = 254$ нм)		
	Молекула ДНК ($M \sim 6 \cdot 10^6$)	<i>E. coli</i>	Фаг T2
Разрывы цепей	$\sim 2 \cdot 10^4$	40	$\sim 1 \cdot 10^3$
Поперечные сшивки ДНК	$\sim 2 \cdot 10^4$	40	$\sim 1 \cdot 10^3$
Сшивки ДНК — белок	$\sim 3 \cdot 10^3$	6	$\sim 1 \cdot 10^2$
Гидраты цитозина (в денатурированной ДНК)	~ 10	0,02	$\sim 0,5$
Димеры тимина	~ 5	0,01	$\sim 0,25$

Считается, что за 30% всех видов УФ-поражений в биологических объектах ответственны димеры тимина. В конечном счете парциальный вклад (Π) каждого типа фотопродуктов в биологический эффект будет определяться тремя факторами: *поперечным сечением поглощения* (s), *квантовым выходом фотохимической реакции* (φ) и *вероятностью биологической реализации элементарного повреждения* (P):

$$\Pi = s_1 \varphi_1 P_1 / (s_1 \varphi_1 P_1 + s_2 \varphi_2 P_2 + \dots + s_n \varphi_n P_n).$$

Таблица 13. Функциональная чувствительность биологических объектов к УФ-свету

Объект	Молекулярный вес ДНК	Доза инактивации (D_{37}), Дж/м ²
<i>E. coli</i> В/s	$2,8 \cdot 10^9$	0,1
<i>E. coli</i> Н/г 30R	$2,8 \cdot 10^9$	20
Фар Т2	$1,3 \cdot 10^8$	2,7
Трансформирующая ДНК <i>Haemophilus influenzae</i>	$6 \cdot 10^6$	20

Первый фактор, зависящий от нуклеотидного состава нуклеиновых кислот и их конформации, наименее вариабелен (плюс-минус десятки процентов).

Более лабилен квантовый выход отдельных реакций. Фотохимические реакции в полинуклеотидах нельзя рассматривать как сумму химических реакций мононуклеотидов, нуклеозидов и азотистых оснований. Наконец, фотохимия нуклеиновых кислот зависит не только от их состава, но и от конформации макромолекулы (микросреды). Например, скорость гидратации цитозина и урацила в нативной ДНК и полиуридиладениловой кислоте намного меньше, чем в денатурированной ДНК и полиуридиловой кислоте соответственно. Вероятность образования димеров между пиримидиновыми основаниями ДНК зависит от природы соседних оснований. Димерообразование подавлено в бактериальных спорах, в сухой ДНК и замороженных растворах ДНК. Этот процесс подавляется также связыванием интеркаляционных красителей.

Значение третьего фактора в наибольшей степени зависит от типа биологического эффекта (мутagenез, лизогения и т. д.), химического состава нуклеиновых кислот, активности репарирующих систем, т. е. от вида организма, его физиологического состояния и условий облучения. Итак, вклад различных фотоповреждений нуклеиновых кислот может достаточно широко варьировать и будет подробно проанализирован при рассмотрении отдельных видов биологических эффектов.

Рекомендуемая литература

Завильгельский Г. Б. Кинетика индуцированных «сшивок» и локальных денатурированных участков в ДНК при УФ-облучении.— В сб.: Ультрафиолетовый свет, вып. 4. М., 1965, с. 137.

Brown J., Johns H. Photochemistry of uracil. Intersystem crossing and dimerization in aqueous solution.— Photochem. and Photobiol., 1968, 8, 273.

Eisinger J., Lamola A., Longworth J., Gratzner W. Biological molecules in their excited states.— Nature, 1970, 226, 113.

Fisher G., Vargese A., Johns H. Ultraviolet-induced reactions of thymine and uracil in the presence of cysteine.— Photochem. and Photobiol., 1974, 20, 109.

Kornhauser A. UV-induced DNA-protein links *in vitro* and *in vivo*.— Photochem. and Photobiol., 1976, 23, 457.

Lamola A. Excited state precursors of thymine photodimers.— Photochem. and Photobiol., 1968, 7, 619.

McLaren A., Shugar D. Photochemistry of proteins and nucleic acids. Oxford, 1964.

Setlow J. The effect of UV-radiation and photoreactivation.— In: Comprehensive Biochemistry. N. Y., 1967, v. 27, p. 157.

Smith K. Physical and chemical changes induced in nucleic acids by ultraviolet light.— Radiat. Res., Suppl., 1966, 6, 54.

Smith K. The biological importance of UV-induced DNA-protein cross-linking *in vivo* and its probable chemical mechanism.— Photochem. and Photobiol., 1968, 7, 651.

Smith K., Apelin R. A mixed photoproduct of uracil and cysteine (5-S-systeine-6-hydrouracil). A possible model for the *in vivo* cross-linking of DNA and protein by UV-light.— Biochemistry, 1966, 5, 2125.

Wacker A., Dellweg H., Weinblum D. Strahlenchemische Veränderung der bakterien DNS *in vivo*.— Naturwissenschaften, 1960, 47, 477.

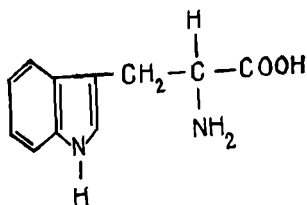
Глава XIII. ДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО СВЕТА НА БЕЛКИ

Наряду с нуклеиновыми кислотами белки относятся к одним из основных акцепторов биологически активного ультрафиолетового света в клетке. Деструктивно-модифицирующее действие ультрафиолетового света связано с фотохимическими повреждениями белковой макромолекулы. Кроме того, благодаря процессам миграции энергии, свет, поглощаемый белком, может использоваться для инициации фотохимических реакций в других хромофорах. Основные хромофоры белков — это остатки ароматических аминокислот: прежде всего *триптофан* и в значительно меньшей степени *тирозин* и *фенил-*

аланин. Они, а также цистин ответственны за функционально активное поглощение света.

1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЭЛЕКТРОННО-ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ БЕЛКОВЫХ ХРОМОФОРОВ

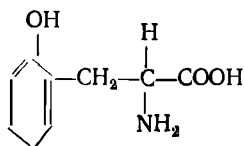
Поглощение света *триптофаном* и его остатками в составе полипептидной цепи белка (триптофанилы) обусловлено системой сопряженных связей его индольного кольца:



Спектр поглощения триптофана характеризуется двумя полосами поглощения с максимумами при 220 и 280 нм. Молярная экстинкция в максимуме длинноволновой полосы около 5000, коротковолновой — около 32 000. Длинноволновая полоса поглощения обнаруживает слабо выраженную колебательную структуру. Обе полосы поглощения обусловлены $\pi-\pi^*$ -переходами в индольном кольце. Считается, что за длинноволновую полосу поглощения ответственны два электронных перехода: $A \rightarrow {}^1L_a$ и $A \rightarrow {}^1L_b$, осцилляторы которых лежат в плоскости индольного кольца и ориентированы друг к другу под углом 66° . Коротковолновая полоса сформирована одним электронным переходом $A \rightarrow {}^1B_b$. Триптофан как в растворе, так и в составе белков обладает выраженной флуоресценцией в ультрафиолетовой области спектра. Максимум спектра флуоресценции триптофана в водном растворе 350 нм. В составе белков положение максимума свечения колеблется от 328 до 350 нм в зависимости от свойств микроокружения хромофора. Квантовый выход флуоресценции триптофана в растворе составляет, по последним уточненным данным, 0,17. В составе белков величина этого параметра сильно варьирует — от 0,02 до

0,4. Длительность флуоресценции триптофана в воде $3 \cdot 10^{-9}$, в составе белка $2 \div 4,6 \cdot 10^{-9}$ с. Триптофан и триптофанилы белков при низких температурах интенсивно фосфоресцируют с τ порядка 7 с и квантовым выходом около 0,1. В спектре фосфоресценции триптофана проявляются три отчетливых максимума: около 410, 440 и 480 нм.

Основной поглощающей группировкой в молекуле тирозина является фенольное кольцо:



Спектр поглощения тирозина представлен двумя полосами с максимумами при 275 ($\epsilon=1250$) и 222 нм ($\epsilon=8000$). Обе полосы образованы $\pi-\pi^*$ -переходами в сопряженной системе фенольного кольца. Тирозин в водном растворе флуоресцирует с квантовым выходом, равным 0,2, и длительностью $3,4 \cdot 10^{-9}$ с. Максимум спектра флуоресценции тирозина в воде и белках расположен при 303 нм. Квантовый выход флуоресценции тирозина в белках очень низок из-за различных эффектов тушения, в основе одного из которых лежит образование водородной связи между фенильным гидроксилом и ближайшей ионизированной карбоксильной группой.

Длинноволновая полоса $\pi-\pi^*$ -поглощения *фенилаланина* обнаруживает максимум при 258 нм и характеризуется низкой молярной экстинкцией ($\epsilon=200$). Фенилаланин обладает чрезвычайно слабой флуоресценцией ($B=0,04$), максимум спектра которой располагается при 282 нм. Флуоресценция фенилаланина в белках обычно не проявляется.

Поглощение УФ-света *цистином*, который не содержит двойных связей, а следовательно, и π -электронов, обусловлено $\sigma-\sigma^*$ -переходом. В области 200—300 нм спектр поглощения описывается монотонной кривой с возрастанием экстинкции по мере уменьшения длины волны. В области провала в спектрах поглощения триптофана и тирозина (250 нм) экстинкция цистина составляет около 200. Цистин не способен к флуоресценции и

фосфоресценции и не передает миграционным путем поглощенную энергию триптофанилам.

2. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФОТОИНАКТИВАЦИИ БЕЛКОВ

Конечным результатом действия ультрафиолетового света на белки является их инактивация, т. е. потеря ферментативной, регуляторной, гормональной, транспортной и иммунологической активностей. Фотоинактивация белков представляет собой *одноквантовый, одноударный необратимый процесс*, о чем свидетельствует экспоненциальный характер зависимости ферментативной активности от дозы облучения и взаимозаменяемость интенсивности и времени облучения. На одноударность процесса указывает также линейная зависимость скорости инактивации от интенсивности света, выполняющаяся даже при таких его интенсивностях, когда количество квантов, падающих в секунду на единицу объема, сравнимо с количеством молекул белка в нем.

Квантовые выходы инактивации различных белков характеризуются достаточно низкими значениями, находящимися в пределах 10^{-2} — 10^{-3} . Это означает, что только *один* удачно поглощенный квант инактивирует макромолекулу, в то время как поглощение остальных 99—999 квантов не приводит к функционально существенным повреждениям. Квантовый выход фотоинактивации белков не зависит от содержания кислорода. Следовательно, инактивация не обусловлена фотоокислением хромофоров. Скорость фотоинактивации белков практически не зависит от температуры ($Q_{10} \approx 1$), во всяком случае для тех интервалов положительных температур, при которых конформация белка остается неизменной. Квантовый выход инактивации возрастает в области предденатурационных температур и уменьшается в 3—4 раза при охлаждении образцов до -196°C . Эффективность фотоинактивации контролируется концентрацией водородных ионов (рН) и ионной силой среды, зависит от состава используемого буфера, а также от присутствия в растворах мочевины, гуанидина и детергентов. Перевод белка из раствора в твердую собст-

венную пленку сопровождается падением квантового выхода инактивации примерно в 3 раза. Обработка теплом и кислородом некоторых белков, облученных в вакууме, приводит к дополнительной темновой инактивации, которая объясняется накоплением в белках скрытых повреждений. На существование скрытых повреждений указывает также изменение чувствительности УФ-облученных ферментов к 5 М мочеvine: облученные и необлученные белки инактивируются мочевиной с различной эффективностью.

3. РОЛЬ ОТДЕЛЬНЫХ ХРОМОФОРОВ В ФОТОИНАКТИВАЦИИ БЕЛКОВ

Основную информацию о природе акцепторов биологически активного света дает метод спектров действия.

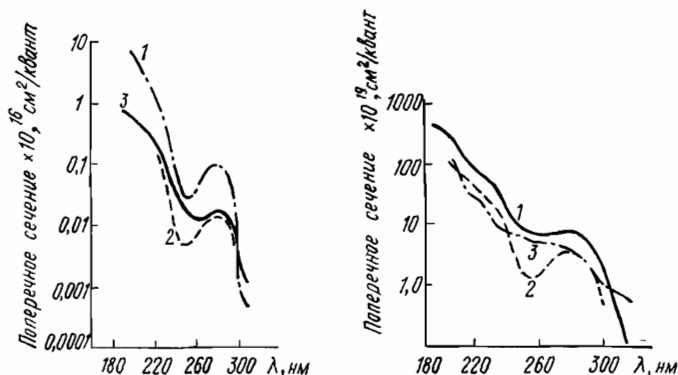


Рис. 47. Спектры действия инактивации растворов альдолазы (1), грамицидина (2) и пленки химотрипсина (3) (McLaren A., Shugar D., 1964)

Рис. 48. Спектр действия инактивации трипсина в пленке (1) и спектры поглощения трипсина (2) и цистина (3) (Setlow R., Doyle B., 1957)

В спектрах действия инактивации самых разнообразных белков отчетливо представлена полоса поглощения ароматических аминокислот при 280 нм (рис. 47). Неполно-

средственное участие триптофанилов в фотоинактивации белков подтверждается также защитным действием красителей — миграционных акцепторов энергии триптофанилов. При этом степень защиты пропорциональна тушению флуоресценции, т. е. уменьшению концентрации возбужденных молекул триптофана. Протективное действие обусловлено индуктивно-резонансной миграцией энергии с синглетных возбужденных уровней триптофанилов к синглетным уровням красителя. Наконец, для отдельных белков отмечается совпадение скоростей фотоинактивации белков и фотолиза триптофанилов в них.

Вклад фотохимии цистина проявляется в увеличении поперечного сечения инактивации богатых цистином белков в области 250 нм (рис. 48), где парциальное поглощение цистина сравнимо с поглощением ароматических аминокислотных остатков. По данным Сетлоу, при облучении различных белков светом с длиной волны 250 нм соблюдается прямая пропорциональность между содержанием в них цистина и величиной квантового выхода фотоинактивации. Тем не менее даже в белках, богатых цистином, при длинноволновом облучении (270—310 нм) преобладает «триптофановая» фотоинактивация, только при коротковолновом (240—260 нм) — «цистиновая». В соответствии с этим белки, инактивированные коротко- и длинноволновым УФ-облучением, судя по данным седиментационного анализа, различаются конечным конформационным состоянием.

Вторым основным методом идентификации акцепторов биологически активного света является хроматографический анализ гидролизатов облученных белков, который позволяет определить, какие и сколько аминокислотных остатков разрушилось под действием света. Хроматографический анализ аминокислотного состава облученных ($\lambda=254$ нм) химотрипсина и трипсина показал, что на одну инактивированную молекулу первого белка приходится один разрушенный остаток триптофана, а в случае трипсина — один остаток триптофана и два-три остатка цистина.

Если за фотоинактивацию действительно ответственны только кванты света, поглощаемые триптофаном и цистином, то поперечное сечение инактивации белка (σ_6) должно быть равно сумме поперечных сечений фо-

толиза триптофана ($\sigma_{\text{тр}}$) и цистина ($\sigma_{\text{ц}}$) с учетом их числа ($m_{\text{тр}}m_{\text{ц}}$) в макромолекуле. При этом $\sigma_{\text{тр}}$ и $\sigma_{\text{ц}}$ определяются экспериментально на основании данных по фотолизу аминокислот в растворе или в белке: $\sigma_{\text{б}} = m_{\text{тр}}\sigma_{\text{тр}} + m_{\text{ц}}\sigma_{\text{ц}}$.

Мак Лареном и Лузом для некоторых (но не всех) белков было получено удовлетворительное совпадение расчетных и экспериментально определенных значений квантовых выходов (ϕ) фотоинактивации из соотношения $\phi = \sigma/s$, где s — поперечное сечение поглощения. Уязвимым местом в подобном подходе является произвольное предположение об одинаковой значимости фотолиза любой аминокислоты для инактивации макромолекулы и совпадении поперечных сечений поглощения и фотолиза аминокислот в свободном состоянии и в составе белка.

Значительно более корректны работы Ю. А. Владимирова с сотр., в которых определялись поперечные сечения инактивации белка и фотолиза входящих в его состав аминокислот не при одной, а при двух длинах волн: 254 и 280 нм. Это позволило им получить ответ на вопрос, приводит ли к инактивации деструкция любого, «первого попавшегося» остатка триптофана (или цистина), либо только определенного «ключевого» аминокислотного остатка. Составив систему уравнений

$$\begin{aligned}\sigma_{\text{б}}^{254} &= m_{\text{тр}}\sigma_{\text{тр}}^{254} + m_{\text{ц}}\sigma_{\text{ц}}^{254}; \\ \sigma_{\text{б}}^{280} &= m_{\text{тр}}\sigma_{\text{тр}}^{280} + m_{\text{ц}}\sigma_{\text{ц}}^{280},\end{aligned}$$

авторы определили поперечные сечения фотолиза триптофана ($\sigma_{\text{тр}}$) и цистина ($\sigma_{\text{ц}}$), а также количество тех остатков, разрушение которых сопровождается инактивацией. Таким способом было установлено, что у пепсина, содержащего четыре остатка триптофана и три остатка цистина, к инактивации приводит разрушение только одного из них. Деструкция остальных трех остатков триптофана и всех трех остатков цистина не приводит к инактивации фермента. Сходная картина наблюдалась и у трипсина. Из четырех остатков триптофана и шести остатков цистина критическое значение имели лишь один остаток триптофана и один остаток цистина. Из этих данных следует, что к инактивации приводит разрушение

не всякого, а только *строго определенного* триптофанового или цистинового остатка. Таким образом, именно триптофан и цистин имеют первостепенное значение для фотоинактивации белков.

Иные возможные элементарные фотохимические повреждения в белке — разрывы полипептидной цепи, фотолиз других алифатических, гетероциклических и ароматических аминокислот — не

вносят решающего вклада в инактивацию. Так, гипотеза об инактивации белков через разрыв пептидных связей оказалась несостоятельной по следующим причинам: 1) согласно Мак Ларену, квантовый выход фотолиза пептидной связи не превышает 0,0003, что, по крайней мере, на порядок ниже квантового выхода инактивации белков; 2) при облучении химотрипсина и лизоцима даже такими дозами УФ-света, которые приводят к почти полной инактивации, заметного увеличения количества свободных аминокислот не наблюдается. И только длительное облучение уже денатурированных

белков сопровождается их фрагментацией в результате прямых разрывов полипептидной цепи.

По аналогичным причинам несущественна роль реакций фотохимического дезаминирования и декарбоксилирования аминокислот в белке, хотя протекание этих реакций четко регистрируется при облучении свободных аминокислот в растворе. Иными словами, фотохимия алифатических аминокислот и разрывы пептидной связи происходят только на «труп» белковой макромолекулы.

Следует подчеркнуть также, что хроматографический анализ белков, облученных умеренными дозами УФ-све-

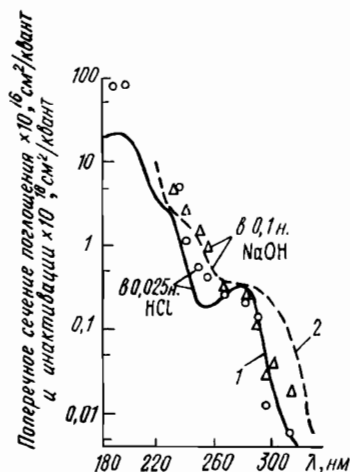


Рис. 49. Спектры поглощения (1, 2) и спектры действия инактивации (O, Δ) РНК-азы (Setlow R., Doyle B., 1957)

та, не выявил разрушения иных остатков аминокислот белка (в том числе и тирозинового остатка), кроме триптофанового и цистинового.

В заключение следует отметить, что некоторые белки, такие как инсулин, рибонуклеаза, отдельные фракции гистонов, вообще не содержат остатков триптофана. Они инактивируются ультрафиолетовым светом с низкой эффективностью благодаря фотодеструкции тирозиновых и цистиновых остатков (рис. 49).

4. МИГРАЦИЯ ЭНЕРГИИ В БЕЛКАХ

Белки содержат тесно сближенные и флуоресцирующие центры с известным перекрытием спектров — остатки ароматических аминокислот триптофана, тирозина и фенилаланина. Поэтому теоретически между ними возможна *внутримолекулярная* миграция энергии по индуктивно-резонансному механизму. Из расположения энергетических уровней вытекает, что миграция энергии может происходить в направлении *фенилаланин* → *тирозин* → *триптофан* → *ионизированный по фенильному гидроксилу тирозин*.

Действительно, многочисленные экспериментальные факты подтверждают этот теоретический прогноз. Наибольшее количество работ посвящено изучению миграции энергии от тирозина к триптофану. В опытах на модельных соединениях (ди- и олигопептидах, содержащих тирозин и триптофан) в спектрах возбуждения триптофановой флуоресценции выявлен вклад тирозинового поглощения — сенсibilизированная флуоресценция. Наибольшая эффективность миграции энергии отмечалась для тех соединений, в которых тирозин и триптофан непосредственно соединены между собой пептидной связью. Разделение тирозина и триптофана алифатическими аминокислотами в полипептиде, т. е. увеличение расстояния между ними, снижало эффективность миграции энергии. С помощью метода спектров возбуждения выявлен также тирозин-триптофановый перенос энергии и в белках. Так, по данным Кронмана и Холмса, эффективность миграции энергии у пепсина составляет 80, у карбоксипептидазы — 81, у трипсиногена — 91,

у альдолазы — 34, у овальбумина — 27%. В ряде случаев экспериментально определенные значения эффективности миграции энергии хорошо коррелируют с расчетными, вычисленными по формуле Ферстера с использованием величины расстояния между хромофорами (данные рентгеноструктурного анализа). Например, три из четырех остатков тирозина в молочном альбумине находятся на расстоянии лишь 4—7 Å от ближайших триптофанилов, и только для четвертого это расстояние составляет 12 Å. У другого белка — карбоксипептидазы А — из 19 остатков тирозина 15 удалены от триптофанилов на расстояние менее 15 Å. Для обоих белков отмечается удовлетворительное совпадение теоретических и экспериментальных величин эффективности миграции энергии.

Данные, полученные методом спектров действия, подтверждаются и поляризационными измерениями: в области поглощения тирозина происходит деполяризация триптофановой флуоресценции. При этом форма поляризационного спектра флуоресценции сывороточного альбумина человека свидетельствует о том, что из каждого семи квантов, высвечиваемых триптофаном, три кванта возникают в результате миграции энергии от тирозиновых остатков.

В отличие от тирозин-триптофановой тирозин-тириновая и триптофан-триптофановая миграции энергии в белках выявляются только с помощью поляризационных измерений. Вебер зарегистрировал значительную по сравнению с флуоресценцией тирозина в растворе деполяризацию флуоресценции тирозинсодержащих белков инсулина, рибонуклеазы и зеина. Явление деполяризации флуоресценции характерно и для поли-*l*-тирозина.

Более сложная картина наблюдается в случае триптофан-триптофановой миграции энергии. Поскольку длинноволновая полоса поглощения триптофана сформирована двумя по-разному ориентированными осцилляторами — 1L_a и 1L_b , эффект деполяризации может быть вызван не только миграцией энергии, но и изменением взаимориентации и вклада различных осцилляторов в поглощение, обусловленным включением триптофана в

состав белка. Однако сохранение эффекта деполяризации при возбуждении флуоресценции светом с длиной волны 296—302 нм в области, где поглощает только осциллятор 1L_a , указывает на протекание эффективной межтриптофановой миграции энергии. Этот вывод подтверждается и опытами, в которых время жизни флуоресценции триптофанилов искусственно занижено. Напомним, что эффективность миграции энергии существенно падает при уменьшении времени жизни флуоресценции донора энергии. В связи с этим показателны три серии опытов.

1. При повышении температуры от 20 до 30° С интенсивность, а следовательно, и время жизни флуоресценции кератина шерсти и фиброина шелка уменьшается, а степень ее поляризации возрастает с 5 до 10%. При последующем снижении температуры степень поляризации снова снижается до 5%.

2. При добавлении флуоресцеина к казеину наблюдается 20-кратное изменение интенсивности его триптофановой флуоресценции вследствие миграции энергии с триптофана на краситель и сокращение времени жизни возбужденного состояния. Параллельно степень поляризации флуоресценции казеина возрастает с 10 до 15—16%.

3. В гемоглобине, флуоресценция которого затухает, по крайней мере, на два порядка по сравнению с глобином благодаря эффективной миграции энергии с триптофанилов на гем, степень поляризации составляет около 20%. В то же время отрыв гема сопровождается ее уменьшением до 10%.

Наконец, в модельных соединениях (например, поли-*l*-триптофана), в которых хромофоры максимально сближены, флуоресценция полностью деполяризована.

Вполне понятно, что все поляризационные измерения проводились в условиях, при которых исключалась релаксационная деполяризация флуоресценции.

При $pH > 7$ происходит ионизация фенольного гидроксила ($R-OH \rightarrow R-O^-$), что приводит к длинноволновому сдвигу ($\lambda_{max} = 297$ нм) спектра поглощения тирозина. В результате этого становится возможной миграция энергии с тирозина и триптофана на тирозинат. В эксперименте подобная миграция энергии регистри-

руется по тушению флуоресценции донора. Такой эффект был обнаружен при $pH=9-11$ у инсулина, рибонуклеазы, лизоцима, папаина. По данным Эдельхоха, эффективность миграции в дипептиде триптофанил-тирозине от триптофана к тирозинату составляет 85%. В соответствии с теорией индуктивно-резонансного переноса в серии олигопептидов триптофанил-(глицил) $_n$ -тирозин тушение триптофановой флуоресценции уменьшалось с увеличением n . При $n>4$ из-за увеличения расстояния между донором и акцептором энергии ($R \gg R_0$) миграция энергии с триптофана на тирозинат полностью прекращается и тушение флуоресценции триптофана уже не наблюдается.

Наряду с рассмотренными внутримолекулярными процессами миграции энергии белковым системам свойствен также *межмолекулярный* перенос энергии. Такой перенос может осуществляться между ароматическими аминокислотами белков и простетическими группами НАДН₂, ФАДом, гемом, ретиналом, билитриенами, витаминами, пигментами, хлорофиллом, каротиноидами и т. д.

Следует подчеркнуть, что миграция энергии между ароматическими аминокислотами может *увеличивать поперечное сечение ключевой фотохимической реакции и разобщать в пространстве место поглощения кванта и место реализации его действия*. Наоборот, межмолекулярная миграция энергии белков — внешний хромофор уменьшает квантовый выход фотохимического повреждения белкового носителя и может *сенсibilизировать в акцепторах фотохимические реакции*, ответственные за многие фотобиологические эффекты.

5. ТРИПТОФАНОВАЯ ФОТОИНАКТИВАЦИЯ

Триптофановая фотоинактивация белков в растворе и в пленке при облучении УФ-светом с длиной волны 260—320 нм осуществляется по *одноквантовому, ударному* механизму. В пользу этого свидетельствуют экспоненциальный характер дозных кривых и взаимозаменяемость интенсивности и времени облучения (соблюдение закона Бунзена — Роско). Триптофановая инактивация белков инициируется не *триплетными*, а *синглетными* электронно-возбужденными состояниями хромо-

форов. Этот вывод следует из пропорциональности между концентрацией синглетных возбужденных состояний и степенью инактивации. Миграционная «откачка» энергии с синглетных уровней триптофанилов у трипсина на краситель флуоресцеин, а у фибриногена — на диметиламинонафталинсульфанилхлорид сопровождается соответствующим уменьшением квантового выхода инактивации белков. В противоположность этому изменение заселенности триплетных уровней триптофанилов белка в результате индуктивно-резонансной миграции энергии триптофанил $\rightarrow$ хризондин и сульфонамид $\rightarrow$ триптофанил не влияет на фоточувствительность белков.

Более того, даже при низких температурах (77 К), при которых стационарная концентрация «триплетов» и, следовательно, вероятность триплетной фотоинактивации на несколько порядков выше, чем при комнатных, сохраняется одноквантовость процесса. В этих же условиях равные дозы прерывистого и непрерывного облучения оказываются одинаково эффективными, хотя в последнем случае условия более благоприятны для триплетной фотохимии.

Характерно, что и сам фотолиз триптофанилов (их фотовыцветание, регистрируемое по тушению флуоресценции) в белках также протекает по *одноквантовому одноударному* механизму.

Для некоторых белков, однако, полулогарифмическая зависимость степени фотолиза триптофанилов от дозы УФ-облучения описывается не одной, а двумя прямыми с изломом на начальных стадиях фотолиза. Это указывает на *гетерогенность* триптофанилов по фоточувствительности — «быстрые» и «медленные» триптофанилы (Л. Х. Эйбус, Т. Н. Калабухова).

Итак, при физиологических условиях именно синглетное возбужденное состояние триптофанила в белках является, по-видимому, непосредственным предшественником фотопродуктов, которые приводят к инактивации макромолекулы.

В опытах Ю. А. Владимирова с сотр. убедительно показано, что триптофан может участвовать в двух реакциях фотохимического разрушения. Реакция 1 характерна для свободной аминокислоты в растворе, а реакция 2 — для остатков триптофана в белке. Хотя обе реакции приводят

к тушению триптофановой флуоресценции (образующиеся фотопродукты не флуоресцируют в свойственной для аминокислоты спектральной области), по своей природе они существенно различаются между собой. Во-первых, квантовый выход реакции 2 мало зависит от содержания кислорода, а реакция 1 резко усиливается в его присутствии; во-вторых, скорости реакций 1 и 2 по-разному зависят от концентрации водородных ионов в среде (рН); в-третьих, стабильные фотопродукты реакций обладают неодинаковыми спектрами поглощения. Это означает, что реакции 1 и 2 приводят к образованию различных стабильных фотопродуктов.

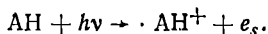
По-видимому, в реакции 1 разрывается пиррольное (но не бензольное) кольцо индола. При этом образуются формилкинуруенин, кинуруенин, оксикинуруенин и оксиантралиловая кислота — конечный стабильный продукт фотодегградации триптофана в обычных условиях.

Реакция 2, судя по спектрам поглощения, не сопровождается разрывом индольного кольца, а приводит к образованию ковалентной связи (сшивки) между иминным азотом индола и соседними группами белковой макромолекулы. В пользу этого свидетельствуют исчезновение полосы поглощения $>NH$ -группы в инфракрасном спектре у глицил-триптофана и тушение флуоресценции (фотовыцветание). Однако этот конечный стабильный фотопродукт триптофана, который, по-видимому, приводит к фотоинаktivации белков, не выделен и его химическая природа пока не ясна.

Образованию конечного стабильного фотопродукта предшествует возникновение ряда первичных (промежуточных) лабильных фотопродуктов свободнорадикальной природы. Появление в белках при УФ-облучении свободных радикалов триптофана зарегистрировано с помощью методов электронного парамагнитного резонанса, фотохемилюминесценции и фототермолюминесценции. Определение их природы стало возможным благодаря использованию низких температур, способствующих накоплению и стабилизации лабильных фотопродуктов.

С помощью различных методических приемов и подходов удалось выяснить, что в этих условиях основной первичной фотореакцией триптофана в белке является

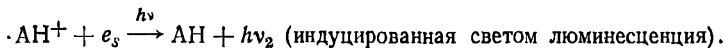
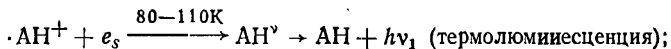
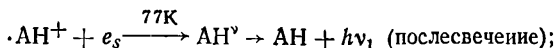
его *фотоионизация* — отрыв электрона от азота имино-группы с образованием *катион-радикала* и *сольватированного электрона* по схеме



При отрыве протона от катион-радикала возникает нейтральный радикал: $\text{АН}^+ \rightarrow \cdot \text{А} + \text{Н}^+$. Другой путь дезактивации катион-радикала — его взаимодействие с ОН-ионами с образованием реакционных ОН-аддуктов.

Нейтральные радикалы триптофана зарегистрированы Гроссвейнером с сотр. в различных белках методом флеш-фотолиза. Данные радикалы характеризуются переходным поглощением с максимумом при 510 нм. Их образование протекает с участием иминогруппы индольного кольца, так как у 1-метилтриптофана переходное поглощение при 510 нм не регистрируется.

Наряду с данными флеш-фотолиза индикатором свободнорадикальных продуктов и их превращений в УФ-облученных белках служит рекомбинационное послесвечение, возникающее при взаимодействии катион-радикала с сольватированным электроном. Этот процесс значительно ускоряется при подогреве образца или подсветке желтым светом, поглощаемым сольватированными электронами. Последовательность событий при рекомбинации промежуточных лабильных фотопродуктов может быть проиллюстрирована следующими реакциями:



Рассмотрим механизм образования катион-радикала $\cdot \text{АН}^+$. Фотоионизация триптофана в замороженных водно-буферных растворах протекает по одноквантовому механизму. Это следует из линейной зависимости интенсивности термолюминесценции от интенсивности возбуждающего света и интенсивности индуцированной видимым светом люминесценции как от интенсивности возбуждающего света, так и интенсивности подсветки в желтой области спектра. Увеличение темнового интер-

вала между возбуждающим (ультрафиолетовым) и индуцирующим (желтым) импульсами в пределах времени жизни триплетов триптофана (6 с) не приводило к возрастанию интенсивности индуцированной люминесценции. Поскольку интенсивность индуцированной люминесценции является показателем концентрации катион-радикалов $\cdot\text{АН}^+$, это указывает на образование $\cdot\text{АН}^+$ не через триплетное, а через синглетное возбужденное состояние триптофана. Однако в сильнощелочных растворах триптофана зависимость светосуммы термолюминесценции и поглощения сольватированных электронов при 600 нм от интенсивности возбуждающего света характеризуется квадратичной зависимостью $v = f(I^2)$, где v — светосумма термолюминесценции или оптическая плотность сольватированных электронов, а I — интенсивность возбуждающего света. Иными словами, в сильнощелочных замороженных растворах фотоионизация представляет собой двухквантовый процесс, в котором второй квант поглощается, по-видимому, триплетной молекулой триптофана. При этом электрон отрывается от молекулы триптофана, находящейся во втором триплетном электронно-возбужденном состоянии.

Для водно-солевых (NaCl) замороженных растворов триптофана показатель степени в приведенной выше формуле варьировал от 1 до 2 в зависимости от способа приготовления образца: наблюдалось «смешивание» одноквантовой и двухквантовой фотохимии в различных пропорциях.

Итак, электрон может успешно отрываться как от синглетной, так и от триплетной возбужденной молекулы триптофана в зависимости от условий микроокружения — матрицы.

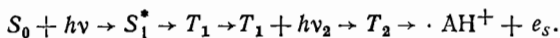
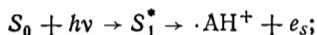
На первый взгляд возможность отрыва электрона от синглетной возбужденной молекулы триптофана противоречит законам термодинамики. Известно, что энергия ионизации ароматических соединений в вакууме обычно равняется 9 эВ, а нижнему колебательному подуровню синглетного возбужденного состояния триптофана соответствует энергия 4,1 эВ. Поэтому кажется, что возбужденная молекула триптофана не должна ионизироваться.

Однако в реальных условиях потенциал ионизации

триптофана значительно снижается. Это обусловлено тем, что одновременно с процессом ионизации происходит выделение энергии электронной и ориентационной поляризации среды (4 эВ), возникающей в результате взаимодействия диссоциирующих партнеров с молекулами окружения. Следует учитывать также, что потенциал ионизации n -электрона азота индольного кольца значительно меньше потенциала ионизации π -электронов. Этот потенциал еще больше уменьшается в результате образования водородной связи с участием иминогруппы. Поэтому наиболее вероятно, что электрон отрывается от азота индольного кольца.

Можно представить себе, что фотоионизация осуществляется по следующему механизму. Электрон возбужденной молекулы за время жизни возбужденного состояния успевает вступить во взаимодействие с диполями растворителя, находящимися в наиболее благоприятной конфигурации. В результате этого энергия связи электрона с молекулой оказывается меньшей, чем сумма энергий возбужденного состояния и взаимодействия с растворителем. Отрыв электрона становится энергетически возможным. Следовательно, вероятность отрыва электрона от молекулы зависит не только от энергии возбужденного состояния, но и от полярности и поляризуемости среды, снижающих энергию ионизации, времени жизни возбужденного состояния и вязкости среды, которые определяют вероятность взаимодействия фотоэлектрона с благоприятной диполь-конфигурацией. При этом диполи растворителя как бы притягивают к себе электрон возбужденной молекулы.

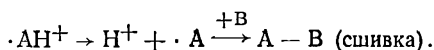
Итак, опыты с модельными соединениями при низких температурах убедительно продемонстрировали принципиальную возможность *ионизирующего действия ультрафиолетового света на триптофан* как по одноквантовому (в условиях, приближающихся к физиологическим), так и по двухквантовому механизму:



Хотя кинетика фотоионизации триптофанилов непосредственно в белке не исследовалась, экспоненциальный

характер их фотодеструкции (как и всего процесса фотоинактивации белков) позволяет прийти к следующему заключению. Если в физиологических условиях белок действительно инактивируется в результате фотоионизации, то эта реакция осуществляется по одноквантовому механизму через синглетные возбужденные состояния.

В дальнейшем, как полагает Ю. А. Владимиров и др., образующийся в белках катион-радикал диссоциирует на протон и нейтральный радикал. Последний, взаимодействуя с соседними группами полипептидной цепи, образует *межмолекулярную ковалентную сшивку — стабильный фотопродукт*:



Если фотолизу подвергается остаток триптофана, непосредственно входящий в состав активного центра фермента, уже этого достаточно, чтобы белок потерял ферментативную активность.

Если существенный триптофанил находится вне активного центра, то сшивка изменяет баланс водородных, гидрофобных и других слабых сил (множественные разрывы связей), поддерживающих нативную конформацию макромолекулы. В результате иницируется кооперативный процесс денатурации, которая и приводит к потере ферментативной активности. В большинстве случаев непосредственной причиной инактивации являются *конформационные изменения макромолекулы*. Действительно, фотоинактивации белка сопутствуют конформационные перестройки и оба эти эффекта наблюдаются при одинаковых дозах УФ-света. УФ-индуцированные конформационные перестройки в белках зарегистрированы с помощью методов седиментации, электрофореза, вискозиметрии, полярографии, электронной микроскопии, люминесценции, оптического вращения, осмометрии, кондуктометрии, измерений поверхностного натяжения, растворимости, скорости дейтериевого обмена, устойчивости к протеолитическим ферментам и теплу, количества титруемых кислых, основных и SH-групп, изучения иммунологических свойств.

В ряде работ отмечается четкая корреляция между степенью инактивации и денатурации белков. Однако не

для всех белков и не при всяких условиях к инактивации ведут генерализованные по всей структуре конформационные перестройки. Иногда бывает достаточно *локальных структурных изменений*. Так, инаktivация уреазы и трипсина не нарушает их комплексования с антителами, а квантовый выход фотоденатурации трипсина, по данным седиментации, в 2—5 раз ниже квантового выхода фотоинактивации. По данным Аугенштейна, эффективная энтальпия (ΔH^*) активации ингибирования трипсина УФ-светом сильно зависит от химической природы субстрата, по деструкции которого оценивается остаточная ферментативная активность. Было показано, что для этилового эфира бензоиларгина и казеина ΔH^* составляет соответственно 2,5 и 4,7 ккал/моль. Поскольку в опытах Аугенштейна субстрат добавлялся после облучения фермента, то фотофизика и фотохимия инаktivации белка во всех случаях были одинаковы, а наблюдавшиеся различия в квантовых выходах инаktivации указывали на локальный характер нарушения конформации, которое по-разному сказывалось на центрах сорбции субстратов.

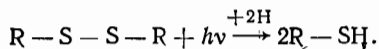
По-видимому, фотоденатурация (локальная или генерализованная) белков может осуществляться и *нефотохимическим* путем, минуя стадии лабильных и стабильных фотопродуктов при *тепловой диссипации энергии электронно-возбужденных состояний* триптофанилов (около 100 ккал/моль), ведущей к множественным разрывам водородных и иных связей. Так, было обнаружено, что аргиназа и уреазы, обладающие, как и другие белки, способностью к существованию в двух дискретных функционально активных конформациях в области физиологически умеренных температур (кооперативный переход $A \rightleftharpoons B$), различаются по квантовым выходам фотоинактивации температурных конформеров А и В. Однако скорости фотолиза триптофанилов и цистина, а также природа конечных стабильных фотопродуктов (данные люминесценции) у температурных конформеров оказались одинаковыми. Отсюда следует, что различия в фоточувствительности конформеров могут быть связаны с дополнительной нефотохимической инаktivацией макромолекулы.

Скорее всего по этой же причине происходит уменьшение $E_{\text{акт}}$ фотоинактивации ($\lambda = 254$ нм) трипсина после дейтерирования, соответствующее, по данным ИК-спектроскопии, разности энергии N—H- и N—D-колебаний. Иными словами, у дейтерированного трипсина облегчен разрыв водородных связей энергией, поглощенной цистином. Сходным образом может быть объяснено уменьшение квантового выхода фотоинактивации трипсина на фоне постоянной скорости фотолиза триптофанилов при изменении вязкости и ионного состава среды, амилазы при образовании фермент-субстратного комплекса, а также гексокиназы при ее комплексовании с регуляторным гормоном инсулином.

Можно думать, наконец, что и отмеченная ранее Мак Лареном сильная зависимость квантовых выходов инактивации белков от pH, ионной силы и состава буфера связана не только с характером их воздействия на фотохимические реакции, но и с изменением вероятности прямой тепловой фотоденатурации.

6. ЦИСТИНОВАЯ ФОТОИНАКТИВАЦИЯ

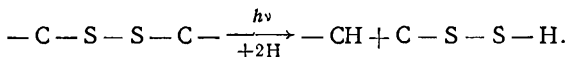
Поглощение квантов УФ-света цистином сопровождается возникновением *свободных радикалов* с локализацией неспаренного электрона на атоме серы ($R-S\cdot$ и $R-S-S\cdot$). Методом электронного парамагнитного резонанса такие радикалы обнаружены как в модельных соединениях (цистин, цистеин, глутатион), так и в белках. Проведенный Дозе химический анализ фотохимических продуктов показал, что *при фотолизе цистина разрываются S—S-связи*:



Эта реакция восстановления цистина до цистеина идет, следовательно, через стадию образования свободных радикалов.

Квантовый выход фотолиза цистина в растворе на два-три порядка выше, чем триптофана, и составляет, по данным Дозе, Мак Ларена и Льюза, 0,11 и 0,13 соответственно. В белках квантовый выход фотолиза цисти-

на еще выше и колеблется от 0,18 в инсулине до 0,75 в химотрипсиногене. Возбужденные молекулы цистина в растворе способны диссоциировать не только по $-S-S-$, но и по $-C-S-$ связи:



Фотолиз дисульфидной связи может происходить при поглощении квантов *как самим цистином, так и ароматическими аминокислотами*. На это указывает возрастание квантового выхода фотолиза цистина в белках при переходе от облучения с длиной волны 254 нм к облучению с длиной волны 280 нм (с расчетом только на его собственное поглощение). Аналогичная сенсibilизация наблюдается и в модельных системах — смеси цистин + триптофан и цистин + тирозин, причем квантовый выход сенсibilизации достигает 0,02.

Очевидно, причиной такой сенсibilизации не может быть индуктивно-резонансная миграция энергии от ароматических аминокислот к цистину, поскольку энергетический уровень возбужденного состояния последнего располагается выше, чем энергетический уровень ароматических аминокислот. Остаются две возможности: 1) фотопродукты ароматических кислот вступают в химическую реакцию с соседними цистиновыми остатками; 2) электроны, «выбитые» из триптофана, мигрируют к дисульфидным связям и восстанавливают их. Действительно, по данным Гроссвейнера, добавление цистина к индолу приводит к исчезновению фотоиндуцированного спектра поглощения сольватированных электронов. Регистрируется также переходное поглощение с максимумом при 420 нм, приписываемое промежуточному продукту взаимодействия цистина и сольватированного электрона — дисульфидному аддукту. Это означает, что цистин эффективно захватывает «выбитые» из индола электроны.

Однако некоторые факты не удается объяснить сенсibilизированным фотолизом цистина. Показано, например, что квантовый выход образования дисульфидных аддуктов гораздо ниже квантовых выходов фотолиза цистина и образования нейтральных радикалов триптофана

в белках, из чего следует, что только небольшая доля «выбитых» из триптофана электронов «захватывается» цистином и поэтому дисульфидные аддукты не могут быть главным интермедиатом в реакции фотолиза дисульфидных связей. Найдено и другое объяснение значительному различию квантовых выходов фотолиза цистина в растворе и белке. Согласно Диксону и Гранту, в белках протекает не миграция сольватированного электрона к цистину, а имеет место лишь торможение рекомбинации радикальных продуктов цистина.

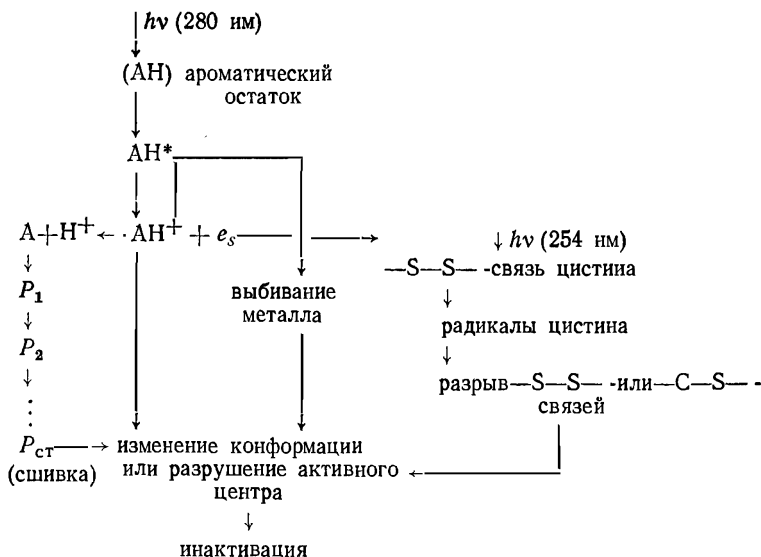
Как и для триптофана, для цистина характерна *гетерогенность* по fotocувствительности даже в пределах одной и той же макромолекулы белка. По данным Аугенштейна, Дозе, Мак Ларена и Льюза, различные —S—S—группы в белковой макромолекуле имеют неодинаковые квантовые выходы фотолиза. Так, в трипсине и рибонуклеазе fotocувствительность некоторых остатков в 5 раз отличается от усредненной fotocувствительности цистина в белке. Как и в случае триптофана, разрывы —S—S—связи цистина, входящего в активный центр, приводят к инактивации белка.

7. ДРУГИЕ ВИДЫ ПОВРЕЖДЕНИЙ БЕЛКА

В литературе дискутируется вопрос о возможности образования *сшивок* между различными белковыми макромолекулами. Подобные сшивки могут иметь значение при плотной упаковке белков в надмолекулярных структурах клетки, например в мембране.

У белков, в состав которых входит металл, играющий существенную роль в каталитической активности, к фотоинактивации приводит его «выбивание» из макромолекулы. Такая ситуация имеет место при УФ-облучении карбоксипептидазы, теряющей в результате разрушения существенного триптофанила атом цинка. Наконец, Л. П. Каюшиным было обнаружено, что свет, поглощаемый триптофаном, может сенсibilизировать разрыв пептидной связи.

Различные механизмы фотоинактивации белков могут быть суммированы в виде следующей схемы:



8. РОЛЬ КОНФОРМАЦИОННОГО ФАКТОРА В ФОТОИНАКТИВАЦИИ БЕЛКОВ

Конформационный фактор оказывает существенное влияние на фоточувствительность белков. Действительно, в многочисленных опытах показано, что самые различные физические и физико-химические воздействия, вызывающие структурные перестройки макромолекул, приводят к значительным изменениям квантовых выходов инактивации.

Ранее уже отмечались различия в фоточувствительности ферментов и комплексов фермент — субстрат, фермент — гормон, а также температурных А и В конформеров белков. При конформационных перестройках в белках, индуцированных ионами и малополярными растворителями, также изменяются квантовые выходы их фотоинактивации.

Зависимость фотоинактивации белков от конформационного фактора (наряду со своим прямым значением для фотобиологии) позволяет характеризовать структурное состояние белка по уровню его фоточувствительности не только в растворе, но и в клетке.

9. ОСОБЕННОСТИ ФОТОИНАКТИВАЦИИ БЕЛКОВ В СОСТАВЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Как известно, в составе биологических мембран белки вовлекаются в интенсивные межмолекулярные взаимодействия, которые контролируют их структурное состояние. Вследствие этого конформация и, следовательно, фоточувствительность белков в составе биологических мембран и в растворе должны различаться.

Наглядным примером мембранного контроля фоточувствительности ферментов является изменение поперечного сечения инактивации эритроцитарной ацетилхолинэстеразы после предрадиационной обработки мембран фосфолипазами А, С и D или удаления из них значительных количеств холестерина, определяющего текучесть липидной фазы. Влияние мембранного окружения на фоточувствительность фермента реализуется, по крайней мере, двумя путями: через изменение конформационного состояния макромолекулы за счет межмолекулярных взаимодействий и повреждение белка продуктами фотохимических превращений липидов (см. гл. XIV).

Сказанное выше означает, что «судьба» мембранного фермента зависит не только от эффективности фотохимических процессов в нем, но и от фотохимических реакций в соседних компонентах, приводящих к структурной перестройке мембраны. Наиболее детально изучено влияние УФ-света на структуру эритроцитарных и синаптосомальных мембран. По мере УФ-облучения детергентоустойчивость эритроцитарных и синаптосомальных мембран, которая определяется их структурным состоянием, растет, а молярная эллиптичность в спектре кругового дихроизма при 222 нм, отражающая степень спирализации белков, уменьшается. УФ-индуцированные структурные перестройки мембран осуществляются по кооперативному закону, что следует из S-образной формы зависимости изменения вышеуказанных параметров от количества УФ-квантов и превышающих единицу нецелочисленных значений графически рассчитанных показателей Хилла.

Иными словами, при УФ-облучении обычная инактивация ферментов протекает на фоне структурной кооперативной перестройки мембраны, что может приводить к

изменению фоточувствительности и модификации физико-химических и каталитических свойств остаточных, не получивших инактивирующего удара макромолекул мембранных ферментов.

Действительно, фоточувствительность мембранной ацетилхолинэстеразы меняется в ходе облучения, на что указывает отклонение кинетики инактивации от кинетики реакции первого порядка, проявляющееся в искажении линейной зависимости логарифма остаточной активности от дозы. Одновременно меняются и каталитические параметры остаточного фермента.

При инактивации ферментов в растворе УФ-свет выступает в роли необратимого неконкурентного ингибитора: в растворе представлены только активные, немодифицированные и полностью инактивированные молекулы фермента. Поэтому по мере УФ-облучения уменьшается только максимальная скорость ферментативной реакции, а константа Михаэлиса остается неизменной. В противоположность ферментам в растворе мембранная ацетилхолинэстераза инактивируется по типу смешанного ингибирования с одновременным изменением максимальной скорости реакции и константы Михаэлиса.

Наряду с изменением каталитических параметров после УФ-облучения наблюдается модификация и физико-химических свойств остаточного мембранного фермента. В случае эритроцитарной ацетилхолинэстеразы зарегистрированы, например, изменения характера рН-зависимости ее активности, константы ингибирования прозеринном, термостабильности, энергии активации ферментативной реакции.

Эффект изменения структурно-функционального поведения мембранного фермента, обусловленный стерическим возмущением его конформации в результате фотомодификации структуры мембраны за его пределами, получил название феномена фотохимической аллотопии. Проявление феномена фотохимической аллотопии, как показали специальные опыты, обусловлено главным образом фотохимическими повреждениями белков, которые под влиянием УФ-света «сшиваются» с соседними компонентами межмолекулярными ковалентными сшивками.

Весьма существенно, что феномен фотохимической

аллотопии проявляется только у интактных мембран, сохранивших в неизменном виде присущую им «мозаику» межмолекулярных сил и взаимодействий. Модификация структуры мембран с помощью ферментов (фосфолипаз, трипсина и нейраминидазы) или ее дезинтеграция ультразвуком приводят к исчезновению феномена фотохимической аллотопии.

10. ФОТОАКТИВАЦИЯ БЕЛКОВ

Относительно редко УФ-свет стимулирует каталитическую активность ферментов. Все известные к настоящему времени эффекты стимулирующего действия света можно подразделить на два основных типа. 1. Обратимая активация каталитической реакции. При этом диссипирующая в тепло энергия используется для создания каталитически благоприятных «мгновенных» стерических деформаций в области активного центра. 2. Необратимая активация фермента, связанная с фотохимическим разрывом (или образованием) ковалентных связей.

К первому типу относятся фотореактивирующий энзим (фотолиаза) и альдолаза. Фотолиаза комплексируется с субстратом (содержащие димеры нити ДНК) в темноте, но для самого ферментативного акта требуется поглощение квантов света (см. гл. XVII). В случае альдолазы каталитическую реакцию ускоряет свет, поглощаемый фермент-субстратным комплексом.

Ко второму типу можно отнести папаин и уроканазу. При УФ-облучении папаина разрушается аминокислотный остаток цистина (Цис-25) (Дозе и Ризи), что приводит к конформационной активации фермента. Менее ясен вопрос о конкретных фотохимических и структурных событиях, приводящих к активации уроканазы. Судя по спектрам действия, к активации приводит свет, поглощаемый не только ароматическими аминокислотными остатками, но и коферментом — α -кетобутиратом ($\lambda = 320$ нм).

Рекомендуемая литература

Владимиров Ю. А. Фотохимия и люминесценция белков. М., 1965.

Владимиров Ю. А., Рощупкин Д. И., Фесеико Е. Е.

О механизме действия ультрафиолетовой радиации на белки.— Биофизика, 1970, 15, 254.

Волотовский И. Д., Шейко Л. М., Конев С. В. Влияние УФ-света на структуру мембран эритроцитов и каталитические свойства мембранной ацетилхолинэстеразы.— Молекулярная биология, 1976, 10, 1027.

Каюшин Л. П., Грибова З. П., Азизова О. А. Электронный парамагнитный резонанс фотопроцессов биологических соединений. М., 1973.

Конев С. В., Волотовский И. Д. Действие УФ-света на белки в растворе и составе биологических мембран.— В сб.: Фотобиология животной клетки. Л., 1979.

Перрасе Н. И., Кондакова Н. В., Калабухова Т. Н., Владимиров Ю. А., Эйдус Л. Х. Изучение механизма ультрафиолетовой инактивации ферментов.— Биофизика, 1968, 13, 24.

Рощупкин Д. И., Пеленицын А. Б., Талицкий В. В. Действие ультрафиолетового излучения на мембранные структуры животных клеток.— В сб.: Роль изменений структуры мембран в клеточной патологии. М., 1977, с. 53.

Рощупкин Д. И., Фесенко Е. Е. Спектральное исследование первичных продуктов фотохимических реакций ароматических аминокислот.— В сб.: Свойства и функции макромолекул и макромолекулярных систем. М., 1969, с. 21.

Смит К., Хэнеуолт Ф. Молекулярная фотобиология. Процессы инактивации и восстановления. М., 1972.

Augenstein L., Ghiron C., Grist K., Mason R. The inactivation of trypsin by UV-light. II. The involvement of intramolecular H-bond disruption.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1961, 47, 1733.

Dose K., Risi S. The action of UV-light of various wavelengths on papain.— Photochem. and Photobiol., 1972, 15, 43.

Grossweiner L. Photochemical inactivation of enzymes.— Curr. Top. Radiat. Res., 1976, 11, 141.

Konev S. V., Volotovskij I. D., Shejko L. M. UV-inactivation of enzymes in supramolecular complexes of biological membranes. The phenomenon of photochemical allotropy.— Photochem. and Photobiol., 1978, 27, 289.

Smith K. Ultraviolet radiation effects on molecules and cells.— In: The science of photobiology. N. Y., 1977, p. 113.

Глава XIV. ДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО СВЕТА НА ЛИПИДЫ

К липидам относится широкий класс относительно низкомолекулярных соединений, обладающих более или менее выраженными гидрофобными свойствами и плохо растворимых в воде. По химическому строению и другим признакам липиды разделяются на несколько больших групп: жиры, воска, фосфолипиды, гликолипиды и стероиды. Наибольшее значение для фотобиологии имеют

фосфолипиды, являющиеся наряду с белками основным строительным материалом биологических мембран. Обязательная составная часть фосфолипидов — остаток фосфорной кислоты, который придает им полярные свойства.

Жирные кислоты, входящие в состав фосфолипидов, могут быть как насыщенными, так и ненасыщенными (содержащими $C=C$ -связи): жирные кислоты с двумя сопряженными двойными связями называются диеновыми, с тремя — триеновыми, с многими — полиеновыми. Обычно липиды поглощают свет в более коротковолновой области ($\lambda < 240$ нм), чем белки или нуклеиновые кислоты. Максимум поглощения ненасыщенных жирных кислот располагается в области 200 нм. Под действием ультрафиолетового света липиды окисляются, причем су-

ществует прямая корреляция между степенью их окисляемости и степенью ненасыщенности жирных кислот.

Процессы УФ-индуцированного окисления приводят к образованию *гидроперекисей* жирных кислот — *первичного относительно стабильного продукта* реакции. Образование диеновых и триеновых гидроперекисей при УФ-облучении сопровождается возникновением новых максимумов поглощения при 233 и 270 нм соответственно (рис. 50). Квантовый выход такой реакции значительно превышает единицу — например, 90 для этиллинолеата (Н. М. Эмануэль и др.). Это означает, что механизмы фотоокисления и хорошо изученного цепного, свободнорадикального автоокис-

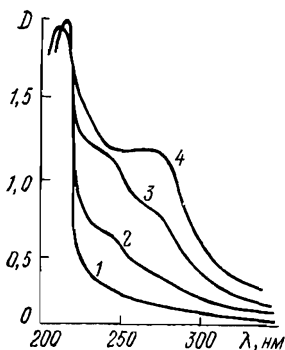
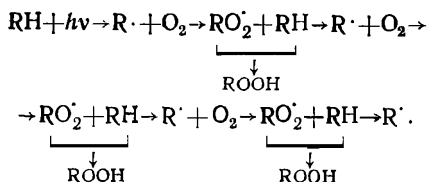


Рис. 50. Спектры поглощения УФ-облученных суспензий фосфолипидов (Потапейко А. Я. и др., 1972):

1 — без облучения; 2, 3, 4 — 1, 2 и 22 мин облучения соответственно

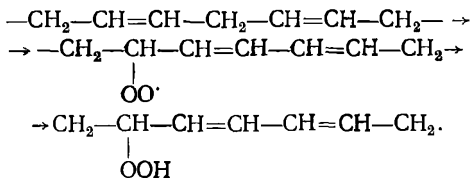
ления липидов близки. Их единство вытекает также из сходства кинетики авто- и фотоокисления ненасыщенных жирных кислот, отмеченного Бейтманом и Ги. На основании этого фотоокисление липида можно представить в виде определенной последовательности реакций



Свет через образование первичного свободного радикала $\text{R}\cdot$ инициирует *цепную реакцию перекисного окисления*; $\text{R}\cdot$, взаимодействуя с кислородом, превращается в перекисный радикал $\text{RO}_2\cdot$, который реагирует с молекулой жирной кислоты RH . При этом регенерирует радикал $\text{R}\cdot$ и возникает молекула гидроперекиси.

Первичной фотохимической реакцией, приводящей к образованию радикала $\text{R}\cdot$, является *отрыв электрона* или атома водорода от одного из атомов углерода жирной кислоты. С энергетической точки зрения энергии кванта света с длиной волны 240 нм, равной около 120 ккал/моль, вполне достаточно, чтобы разорвать любые $\text{C}-\text{H}$ -связи в жирных кислотах. Энергия $\text{C}-\text{H}$ -связей составляет 93 ккал/моль для насыщенных соединений с длинной цепью, 89 ккал/моль для связи у $\text{C}=\text{C}$ -углеродных атомов ненасыщенных соединений и 77 ккал/моль для связи у углерода, находящегося в α -положении к $\text{C}=\text{C}$ -связи. Поэтому при прочих равных условиях более вероятен разрыв $\text{C}-\text{H}$ -связей у α -углеродного атома.

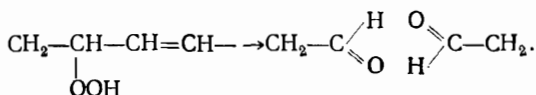
В случае ненасыщенных жирных кислот при образовании $\text{RO}_2\cdot$ и ROOH связь $\text{C}=\text{C}$ перемещается и возникает сопряженная (конъюгированная) система двойных связей:



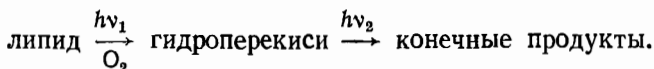
Возможно также образование из двух перекисных радикалов димерного бирадикала $\text{R}_1-\text{O}-\text{O}-\text{R}_2$. Цепи свободнорадикального окисления имеют различную длину вследствие их обрыва при взаимодействии радикалов $\text{R}\cdot$ +

+ R', R' + RO₂ и RO₂ + RO₂, приводящем к образованию молекулярных продуктов нерадикальной природы. Цепи обрываются также под влиянием металлов переменной валентности (например, железо) и антиоксидантов (например, α-токоферол).

Образовавшиеся гидроперекиси претерпевают дальнейшие химические превращения с образованием ряда стабильных продуктов окисления и прежде всего *альдегидов*:



Типичный представитель конечных продуктов окисления — *малоновый диальдегид* $\begin{array}{c} \text{H} \\ \diagup \\ \text{O} = \text{C} - \text{CH}_2 - \text{C} \begin{array}{l} \text{H} \\ \diagup \\ \text{O} \end{array} \end{array}$, который идентифицируется в липидных препаратах по реакции с тиобарбитуровой кислотой. При этом образуется окрашенное соединение с максимумом поглощения при 532 нм. Образование конечных продуктов окисления — липидов, по данным Ю. А. Владимирова с сотр., включает *две последовательные фотохимические реакции*:



Процесс в целом носит двухквантовый характер, причем реакция распада гидроперекисей (вторая стадия) происходит и в отсутствие кислорода. Двухквантовый двухстадийный механизм перекисного фотоокисления липидов делает его зависимым от длины волны действующего света: длинноволновый УФ-свет приводит к накоплению преимущественно гидроперекисей, в то время как коротковолновое излучение, интенсивно поглощаемое гидроперекисями, способствует образованию конечных продуктов (альдегидов).

Как известно, в клетках преобладающая часть липидов сосредоточена в биологических мембранах. В липидной фазе мембран наиболее существенной и эффективно протекающей реакцией является перекисное, свободнорадикальное фотоокисление полиненасыщенных жирных кислот — фосфолипидов. При этом фотолиз может ини-

цироваться как непосредственным поглощением квантов света липидом, так и через поглощение света другими молекулами. В качестве фотосенсибилизаторов выступают такие соединения, как триптофановые и тирозиновые хромофоры белков, порфирины, флавины и т. д. Отсюда следует, что перекисное окисление липидов может инициироваться не только ультрафиолетовым, но и видимым светом. (Относительный вклад последнего процесса для мембран и клеток невелик.)

Каково же значение перекисного окисления липидов в фотобиологии? Прежде всего уже само разрушение липидов может привести к серьезным нарушениям структурной организации мембран. Вместе с тем известно, что продукты их окисления имеют достаточно выраженные токсические свойства. Результатом действия перекисей липидов и продуктов их дальнейших превращений (альдегидов и кетонов) может быть повреждение белков (прежде всего, сульфгидрильных групп), обусловленное как их окислением, так и образованием стабильных ковалентных связей между белком и продуктами окисления липидов. Известно, что эти продукты способны инактивировать многие ферменты. Кроме того, они окисляют ряд других биологически важных соединений: цистеин, глутатион, нуклеотиды, витамины А и D, липоевую кислоту и т. д.

С другой стороны, перекиси липидов могут увеличивать проницаемость мембран как в результате повреждения белков, так и вследствие влияния на липидную часть биологической мембраны. В предельном случае наступает глубокая дезинтеграция мембран. Однако в нормальной мембране цепное перекисное фотоокисление липидов, по-видимому, заторможено вследствие структурных ограничений и наличия разнообразных антиоксидантов.

Рекомендуемая литература

Владимиров Ю. А. Сверхслабые свечения в биохимических реакциях. М., 1966.

Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.

Потапенко А. Я., Рощупкин Д. И., Когон Е. А., Владимиров Ю. А. Исследование действия УФ-света на биологические

мембраны. Изменение электропроводности бимолекулярных фосфолипидных мембран.— Докл. АН СССР, 1972, 202, 882.

Рощупкин Д. И., Пеленицын А. Б., Талицкий В. В. Действие ультрафиолетового излучения на мембранные структуры животных клеток.— В сб.: Роль изменений структуры мембран в клеточной патологии. М., 1977, с. 53.

Семенов Н. Н. О некоторых проблемах химической кинетики и реакционной способности. М., 1958.

Свободнорадикальные состояния и их роль при лучевом поражении и злокачественном росте. Тезисы докл. М., 1971.

Тарусов Б. Н., Иванов И. И., Петрусович Ю. М. Сверхслабое свечение биологических систем. М., 1969.

Эмануэль Н. М., Лясковская Ю. П. Торможение процессов окисления жиров. М., 1961.

Bateman U., Gee G. A kinetic investigation of the photochemical oxidation of certain non-conjugated alkenes.— Proc. Roy. Soc. Ser. A, 1948, 195, 391.

Lundberg W., Jörni P. Peroxidation of polyunsaturated fatty compounds.— Prog. Chem. Fat. Lipids, 1968, 9, 379.

Глава XV. ЛЕТАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ СВЕТА

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭФФЕКТА

Ультрафиолетовое излучение оказывает летальное действие в основном на животные, растительные, бактериальные вирусы (фаги) и одноклеточные организмы (микробы и простейшие). Летальный эффект у высокоорганизованных многоклеточных (например, птиц, млекопитающих и т. д.) при облучении их ультрафиолетовыми лучами в реальных дозах практически не наблюдается, хотя в принципе он может быть достигнут при очень больших дозах.

У фагов летальное действие проявляется в утрате способности к внутриклеточному размножению, а у микроорганизмов — в гибели клеток до первого деления или чаще всего в первом или последующих поколениях. В конечном счете одиночная клетка теряет способность к образованию макроколоний. Причиной гибели клетки является повреждение жизненно важных молекулярных структур.

Если клетка гибнет от одного «удачно» поглощенного кванта (попадание в мишень), то процесс инактивации клеточной популяции описывается экспоненциальной зависимостью, основанной на распределении Пуассона:

$$N = N_0 e^{-\sigma D},$$

где N_0 — число исходных клеток; N — число выживших клеток; σ — поперечное сечение инактивации; D — доза; σD — среднее число ударов по чувствительной единице (при $\sigma D = 1$ на клетку в среднем приходится по одному летальному удару). Отсюда σ равно обратной величине дозы, при которой выживаемость составляет 37% ($e^{-1} = 0,37$):

$$\sigma = \frac{1}{D_{37} \text{ (в квантах на 1 мм}^2\text{)}}.$$

В большинстве случаев наблюдается экспоненциальная зависимость выживаемости от дозы облучения, т. е. имеет место *одноударный процесс* — гибель клетки или фага от «удачного» попадания единственного кванта (хотя гибель клетки происходит лишь после поглощения 10^5 — 10^7 квантов).

При гетерогенности (по фоточувствительности) клеточной популяции процесс инактивации описывается бифазной кривой, отражающей наложение двух одноударных экспоненциальных реакций. Известны, однако, случаи и многоударной инактивации. Двухударная инактивация описывается уравнением

$$N/N_0 = e^{-\sigma D} + \sigma D e^{-\sigma D} = e^{-\sigma D(1 + \sigma D)},$$

а многоударная (k ударов) — уравнением

$$N/N_0 = 1 - e^{-\sigma D} \sum_{k=0}^{k=n-1} (\sigma D)^k / k!,$$

где n — число попаданий.

Еще в 1929 г. Гейтс показал, что спектр действия летальности микроорганизмов совпадает не со спектром поглощения клетки в целом, а со *спектром поглощения нуклеиновых кислот*. В дальнейшем этот факт был подтвержден многочисленными экспериментами.

Как правило, спектры действия летального эффекта имеют выраженный нуклеиновый максимум при 260—265 нм (рис. 51). Однако для отдельных организмов описаны как чисто «белковые» с максимумом при 280 нм, так и смешанные спектры летального эффекта с макси-

мумами при 260 и 280 нм, указывающие на то, что в цепции света, приводящего к гибели клетки, участвуют и белки и нуклеиновые кислоты.

Слабым инактивирующим действием на клетки обладает и ближний УФ-свет ($\lambda > 320$ нм). Чтобы получить летальный эффект при облучении ближним ультрафиолетовым светом, необходимы дозы в 10^5 раз большие, чем при использовании среднего ультрафиолета.

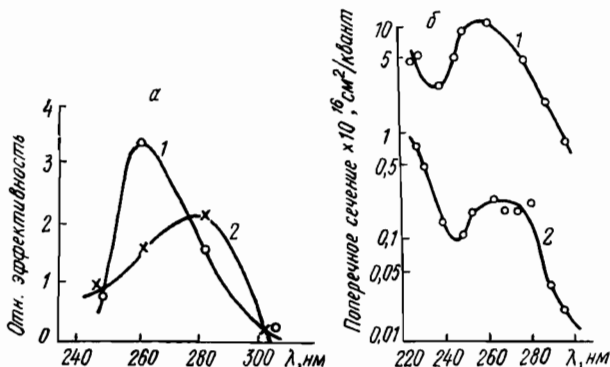


Рис. 51. Спектры действия вируса гриппа (McLaren A., Shugar D., 1964):

а — подавления инфекционной активности (1) и геммагглютинации (2); *б* — destruction (1) и способности к интерференции (2)

Механизм действия ближнего света изучен недостаточно. Имеются лишь данные о том, что летальный эффект света с длиной волны более 320 нм может быть связан с непрямым повреждением ДНК. Дальний ультрафиолетовый свет ($\lambda < 200$ нм), наоборот, весьма эффективен, что может быть обусловлено его ионизирующим действием.

2. ИНАКТИВАЦИЯ ФАГОВ И ПЛАЗМИД

Очень удобной моделью для изучения молекулярных механизмов действия УФ-света являются фаги. Их строение достаточно просто — одна молекула ДНК или РНК и белковый чехол. Как и все вирусы, фаги не обладают собственным метаболизмом.

Квантовый выход инактивации различных фагов колеблется от 10^{-2} до 10^{-5} . Потеря фагом биологической активности может быть результатом повреждения *нуклеиновой кислоты* (тогда он теряет способность к размножению) или *белкового чехла* (тогда фаг неспособен проникнуть в клетку).

Как правило, потеря вирулентности осуществляется по *одноударному* механизму и имеет «*нуклеиновый*» спектр действия (рис. 51, 52). Дополнительное облучение уже инактивированного фага повреждает по *многоударному* механизму его чехол (белковый спектр действия), что связано с фотоденатурацией многих молекул белка (см. рис. 51). Однако у некоторых фагов фоточувствительность нуклеинового и белкового компонентов соизмерима. Так, белковый спектр действия с максимумом при 280 нм (см. рис. 51) был получен для подавления способности к агглютинации вируса гриппа. У некоторых фагов (бактериофаг *Bact. megatherium*, фаг T1 и др.) в спектрах действия потери инфекционной активности наряду с более значительным нуклеиновым максимумом при 260 нм представлен и белковый максимум при 280 нм.

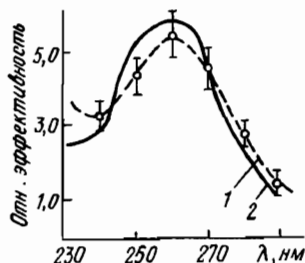


Рис. 52. Спектр действия инактивации вируса X картофеля (1) и спектр поглощения вирусной РНК (2) (Kleczkowski A., Govier D., 1969)

Появление белкового максимума может быть обусловлено повреждением чехла с потерей фагом сорбционно-проникающих свойств, повреждением ДНК свободнорадикальными продуктами фотолиза белка и сшивками ДНК — белок. Если учитывать величины квантовых выходов всех трех процессов, последняя причина кажется наиболее вероятной.

Тем не менее у фагов основным хромофором и субстратом для фотохимических повреждений является нуклеиновая кислота, а не белок. Так, Сетлоу и Бойсом было показано, что квантовый выход инактивации фага φX174 в пересчете на поглощение нуклеиновой кислоты

почти не изменяется в спектральном интервале 235—280 нм. Постоянство квантового выхода фотопроцесса в пределах полосы поглощения активного света, как известно, свидетельствует об однородности хромофора. Подавление инфекционной активности мало зависит и от того, облучается ДНК фага или целый фаг.

В отличие от этого фоточувствительность свободной РНК выше, чем в интактном вирусе табачной мозаики (ВТМ), что может быть обусловлено защитным эффектом белкового чехла или различиями в конформации нуклеиновой кислоты в растворе и фаге. В этой связи большой интерес представляют опыты Мак Ларена, показавшего, что два различных штамма вируса табачной мозаики (U1 и U2) обладают различными квантовыми выходами инактивации в водной суспензии, но характеризуются одинаковой фоточувствительностью изолированных РНК, и квантовый выход инактивации реконструированных вирусов, состоящих из РНК U1+белок U2 и РНК U2+белок U1, определяется фоточувствительностью белкового донора. Результаты этих опытов скорее всего можно объяснить тем, что белковая оболочка при образовании гибридных вирусов способствует возникновению своей «комплементарной» конформации РНК, которая и определяет уровень фоточувствительности вируса.

Характер элементарных фотохимических реакций в нуклеиновых кислотах, приводящих к гибели фагов, в настоящее время более или менее ясен. Инактивация ДНК-содержащих фагов, по-видимому, связана с *фотодимеризацией*, а не фотогидратацией оснований, поскольку после пострadiaционной тепловой обработки, достаточной для разрушения гидратов, их активность не восстанавливается.

На доминирующую роль пиримидиновых димеров и прежде всего димеров тимина в гибели фагов прямо указывают опыты Г. Б. Завильгельского с сотр. Ими была обнаружена прямая пропорциональная зависимость между абсолютным числом тиминовых остатков и поперечным сечением инактивации у природной и репликативной одноплетевой ДНК фага ϕ X174. Хроматографический анализ гидролизованной ДНК фагов Т4 и ϕ X174, облученных биологическими дозами ультрафиолетового

света, выявил тиминовые и урацил-тиминовые димеры.

Наконец, летальные УФ-повреждения ДНК фагов фотореактивируются. Так, после проникновения в клетку-хозяина активность Т-фагов возрастает примерно в 1000 раз при облучении видимым светом. Этот факт — наиболее веский аргумент в пользу тиминовых димеров, поскольку именно они элиминируются в ходе фотореактивации.

Характерно, что для большинства фагов число димеров, возникших под действием УФ-света, больше числа летальных ударов. Так, по расчетам Зауербира и Хауга, только один из семи димеров приводит к инактивации фага Т4. Это может в первую очередь означать, что роль различных участков ДНК неравноценна и димеризация оснований в значительной части ДНК не приводит к инактивации. Иначе говоря, в цепи ДНК существуют *критические и некритические участки*.

Повреждения в некритических участках приводят к *ненаследуемым* эффектам (удлинение латентного периода одноступенчатого цикла размножения, периода лизиса) у бактериофагов, имеющих двухтяжевую ДНК или РНК. Эффект удлинения латентного периода носит кумулятивный характер, и для него, как и для обычного летального эффекта, характерно явление фотореактивации. Это означает, что ненаследственные повреждения в некритических участках ДНК, по-видимому, имеют димерную ($\overline{T-T}$) природу (чем больше повреждений, тем длительнее латентный период), и в спектре их действия, как правило, обнаруживается нуклеиновый максимум.

Инактивация РНК-содержащих вирусов протекает с участием не только одних пиримидиновых димеров. Существенный вклад в инактивацию вносят и *гидраты оснований*. Например, из РНК облученного вируса табачной мозаики выделены следующие фотопродукты: пиримидиновые гидраты, два типа циклобутановых димеров и два фотопродукта неизвестной природы. При этом на один летальный удар приходилось 1,2 гидратов урацила, 0,9 гидратов цитозина и 0,8 пиримидиновых димеров (из них 0,5 циклобутановых). Возникновение при УФ-облучении различных типов повреждений ВТМ подтверждается наличием фотореактивируемых и нефотореактиви-

руемых дефектов в РНК вируса табачной мозаики, а также зависимостью соотношения данных дефектов в РНК от длины волны облучения.

УФ-свет эффективно инактивирует и *плазмиды* — внехромосомные ДНК бактериальных клеток. Плазмиды представляют собой двухцепочечные кольца, закрученные в суперспираль. В бактериальной клетке представлено около 20 мелких ($M \sim 5 \cdot 10^6$) и 1—2 крупных ($M \sim 10^8$) плазмид. Основной вклад в инактивацию плазмид вносят пиримидиновые димеры. При этом, как показано Г. Б. Завильгельским, скорость УФ-инактивации плазмид не зависит от их молекулярного веса. Такой вывод сделан на основании экспериментов, в которых облучали набор плазмид, отличающихся друг от друга весом встроенного в их структуру фрагмента ДНК *E. coli*. В то же время эффективность сенсibilизированной 8-метоксипсораленом инактивации (за счет межнитевых сшивок) была пропорциональна молекулярному весу плазмиды. Кроме того, был сделан и другой важный вывод о том, что эффективность репарации пиримидиновых димеров определяется молекулярным весом плазмиды (см. гл. XVII).

Итак, при облучении фагов и плазмид биологически активный свет поглощается преимущественно нуклеиновыми кислотами. Основная фотохимическая реакция, приводящая к их гибели, — образование пиримидиновых димеров и в первую очередь димеров тимина. У РНК-содержащих вирусов определенный вклад в инактивацию вносят также фотогидраты оснований.

3. ИНАКТИВАЦИЯ КЛЕТОК

Летальное действие УФ-света на клетки проявляется, как правило, не в мгновенной их гибели под лучом, а в утрате способности к многократному воспроизведению. Такие клетки могут до первого или второго деления нормально выполнять свои физиологические функции. Поэтому самым распространенным тестом на летальное действие УФ-света служит потеря клетками способности формировать микро- или макроколонии.

Микроорганизмы — наиболее традиционный объект для изучения действия УФ-излучения на клетки. Их чув-

ствительность к УФ-свету широко варьирует в зависимости от вида. Например, доза света с длиной волны 254 нм, необходимая для подавления способности к образованию колоний на 90% (LD_{90}), равна для *Bact. megatherium* 113, а для *M. radiodurans* 1600 Дж/м².

По степени возрастания фоторезистентности одноклеточные организмы можно расположить в следующий ряд: микробы (палочки—кокки) > грибы (гаплоидные дрожжи и актиномицеты — диплоидные дрожжи — полиплоидные дрожжи — плесневые грибы) > водоросли (хлорелла — хламидомонада) > простейшие. Рекорд по фоторезистентности у простейших принадлежит жгутиконосцу *Bodo marino* ($LD_{90}=11\ 200$ Дж/м²). Еще большие дозы необходимы для подавления прорастания (летальный эффект) пыльцы высших растений: $LD_{37}=10^5-10^6$ Дж/м².

Резистентность клеток животных и человека в культуре относительно низка: $LD_{90}=10-50$ Дж/м². Как правило, пигментированные клетки более устойчивы к свету, чем непигментированные, а диплоидные и полиплоидные устойчивее, чем гаплоидные.

Меняется фоточувствительность и в ходе жизненного цикла клетки. Из четырех периодов развития клетки — G_1 (постмитозный), S (синтез ДНК), G_2 (постсинтетический) и M (митотический) — наибольшую фоточувствительность микроорганизмы проявляют в постмитозном периоде. На фоточувствительность клеток оказывают влияние также их пищевой режим, характер окислительного обмена, фаза роста культуры, температурные и световые воздействия до и после облучения, обработка клеток химическими протекторами или сенсibilizаторами. Так, резистентность микроорганизмов повышается при культивировании их на глюкозо-пептонных средах или в аэробных условиях. Минимальная фоточувствительность наблюдается также у микроорганизмов при переходе от логарифмической к стационарной фазе роста. Эффективность бактерицидного действия УФ-света слабо зависит от температуры в момент облучения; Q_{10} варьирует от 1,04 до 1,1 вплоть до температуры -35°C .

Чаще всего гибель диплоидных и полиплоидных организмов — многоударный, а гаплоидных — одноударный процесс. Например, по данным Ли и Хайнеса, для некоторых летальных эффектов закон Бунзена — Роско вы-

полняется в пределах тысячекратных изменений интенсивности облучения.

Хотя квантовый выход бактерицидного действия ультрафиолетового света невелик (10^{-5} — 10^{-8}), одноударность процесса означает, что всего *один-единственный* «удачно» поглощенный квант приводит к гибели клетки. Уже из этого следует, что УФ-свет прежде всего по-

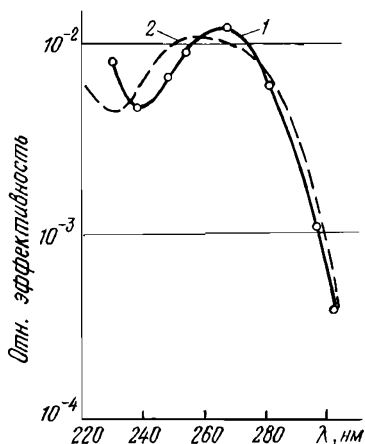


Рис. 53. Спектр действия гибели *E. coli* (1) и спектр поглощения ДНК (2)

вреждает не многократно продублированные биомолекулы, а уникальные молекулярные структуры, представленные в клетке в единственном экземпляре, как, например, молекулы ДНК. Естественно, что при локализации повреждения в ДНК облучение не должно сразу же приостанавливать метаболические процессы в клетках, и их гибель будет наблюдаться после одного или нескольких делений, когда после многократного матричного синтеза (и-РНК, белков) у дочерних клеток проявится критический дефект генома. Действительно, в эксперименте зарегистри-

рована гибель клеток не только во втором, но и в последующих поколениях. В то же время облученные клетки сохраняют функцию хозяина — способность поддерживать размножение фагов и нормально дышать в течение нескольких часов.

Решающая роль ДНК в летальном эффекте УФ-лучей находит отражение в спектрах летального действия самых разнообразных одноклеточных биологических объектов (рис. 53). Как правило, в спектрах действия выявляется отчетливая полоса при 260—270 нм, иногда с дополнительным белковым максимумом при 280 нм. При этом очевидно, что кванты света, *адресованные белку и ДНК, вызывают гибель клетки совсем по-разному*. Действительно, облучение дрожжей светом с длиной волны

297 нм (белковое повреждение) приводит к гибели клеток только до почкования, в то время как при нуклеиновом повреждении ($\lambda=265$ нм) проявляются все три типа поражения — до почкования, после первого и второго деления.

Какие же фотоповреждения ДНК в клетке приводят к ее гибели? Считается, что к летальным повреждениям клеток приводит образование пиримидиновых, прежде всего *тиминовых димеров*. Об этом свидетельствуют следующие факты: 1) увеличение фоточувствительности ряда микроорганизмов по мере увеличения в них содержания тимина; 2) обнаружение димеров в гидролизатах ДНК клеток, облученных ультрафиолетовым светом в дозах $D_{37}-D_{90}$, причем различные воздействия на клетку, увеличивающие или уменьшающие ее фоточувствительность, сопровождаются аналогичным изменением концентрации димеров тимина в клетке; 3) возможность снятия значительной части летального действия УФ-излучения видимым светом (фотореактивация), величина которого во многих случаях коррелирует с мономеризацией димеров; 4) способность ферментов темновой репарации, вырезающих $\overline{T-T}$ -димеры из ДНК, уменьшать фоточувствительность клеток; параллелизм между фоторезистентностью и активностью различных репарирующих ферментов; резкое возрастание фоточувствительности у мутантов, дефектных по одному из репарирующих ферментов; параллелизм между выщеплением димеров, определяемых в ДНК-содержащей фракции клеток (кислоторастворимая фракция), и восстановлением биологической активности облученного объекта; 5) большая близость спектра действия инактивации трансформирующей активности ДНК в растворе к спектру поглощения тимидина, чем самой ДНК, и параллелизм между величиной восстановления активности ДНК и степенью мономеризации тимина пострadiационным коротковолновым облучением (230 нм); 6) резкое увеличение бактерицидной активности ультрафиолетового света после галогенизации пиримидиновых оснований ДНК, увеличивающей ее фоточувствительность.

Однако роль каждого из димеров, возникающих при ультрафиолетовом облучении, неодинакова. Например,

по данным Сетлоу, клетка *E. coli* В₈-1 гибнет только после образования в ней 10 циклобутановых пиримидиновых димеров. Это означает, что 9 из 10 димеров нелетальны для клеток.

Вклад других фотохимических повреждений ДНК, образующихся при расчете на один летальный удар в еще меньших количествах, невелик. Однако в отдельных случаях роль такого повреждения, как сшивки белок — ДНК, становится весьма весомой. Принимая в расчет сшивки, можно, например, понять, почему радиорезистентная линия бактерий *M. radiodurans* менее чувствительна к свету с длиной волны 260 нм, чем *E. coli*, а при облучении светом с длиной волны 280 нм фоточувствительность этих микроорганизмов становится сопоставимой.

Образованием сшивок ДНК — белок можно объяснить и гибель животных клеток в культуре. По данным Александера и Моросона, выживаемость клеток лимфомы и HeLa хорошо коррелирует с уменьшением экстрагируемости ДНК, т. е. с количеством сшивок ДНК — белок. Косвенным свидетельством в пользу возникновения при УФ-облучении сшивок ДНК — белок является отсутствие строгого параллелизма между количеством димеров и выживаемостью животных клеток в культуре в условиях низкой активности системы темновой репарации.

В противоположность вегетативным формам споры микроорганизмов отличаются высокой резистентностью к ультрафиолету. Даже при фотопревращении 40% всех тиминовых остатков они сохраняют жизнеспособность. УФ-повреждения спор не фотореактивируются и связаны, как показал Варгезе, не с циклобутановыми димерами тимина, а с особым «споровым» фотопродуктом — 5-тиминил-5,6-дигидротимином. Отмечается удовлетворительная корреляция между фоточувствительностью спор и количеством «спорового» продукта при изменениях температуры облучения и состава среды.

Образование в спорах этого аномального фотохимического продукта в первую очередь обусловлено особой конформацией ДНК, отличной от модели Уотсона — Крика. Как известно, для частично обезвоженной ДНК характерна конфигурация, при которой плоскости оснований параллельны друг другу и наклонены к оси спирали

под углом 70° , что создает значительные препятствия для образования циклобутановых димеров. В обычных условиях (при относительной влажности более 80%) ДНК имеет В-конфигурацию, при которой плоскости оснований параллельны друг другу и перпендикулярны к оси спирали, и, следовательно, стерические условия для возникновения димеров оптимальны.

В заключение необходимо сделать некоторые замечания общего характера. Гибель клетки от фотохимического повреждения наступает вследствие: 1) летальных мутаций; 2) утраты хотя бы одной из молекул ДНК способности к репликации; 3) нарушения процесса транскрипции. Механизмы гибели клетки через белковые хромофоры изучены слабо. Можно предположить самые различные варианты: инактивацию ключевых ферментов, нарушение проницаемости мембран, сшивки белок — ДНК, летальный мутагенез продуктами белковой фотохимии и др. Вполне понятно, что удельный вес белковой фотохимии будет возрастать с увеличением размеров клетки, т. е. с увеличением оптической плотности белкового слоя, отделяющего ядро клетки от ее поверхности.

Отмеченные вариации фоточувствительности клеток в значительной степени определяются наличием и эффективностью различных как световых, так и темновых репарационных систем, способных освобождать ДНК клетки от значительной части (до 98%) элементарных фотохимических повреждений. Последние механизмы будут рассмотрены ниже.

Рекомендуемая литература

Дубров А. П. Генетические и физиологические эффекты действия УФ-радиации на высшие растения. М., 1968.

Завильгельский Г. Б., Ильяшенко Б. Н. Роль пиримидинов в процессе инактивации бактериофагов УФ-излучением. — Вестн. АМН СССР, 1966, вып. 2, с. 43.

Завильгельский Г. Б., Парибок В. П. Молекулярные механизмы действия УФ-излучения на клетку. — В сб.: Ультрафиолетовое излучение, вып. 5. М., 1971, с. 5.

Самойлова К. А. Действие УФ-радиации на клетку. Л., 1967.

Сойфер В. Н. Молекулярные механизмы мутагенеза. М., 1969.

Jagger J. Introduction to research in UV-photobiology. New Jersey, 1967.

Kleczkowski A., Govier D. Action spectrum for inactiva-

tion of the infectivity of potato virus by UV-radiation.— Photochem. and Photobiol., 1969, 10, 53.

— McLaren A., Shugar D. Photochemistry of proteins and nucleic acids. Oxford, 1964.

Sauerbier W., Haug A. An approach to the determination of the maximal contribution of thymine dimer to ultraviolet-inactivation of bacteriophage T4vx.— J. Molec. Biol., 1964, 10, 180.

Vargese A. Photochemistry of thymidine as a thin solid film.— Photochem. and Photobiol., 1971, 13, 357.

Глава XVI. ИНГИБИРОВАНИЕ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СИНТЕЗОВ

Одной из непосредственных причин гибели клеток при их облучении ультрафиолетовым светом является *инактивация биосинтетического аппарата*, ответственного за синтез жизненно важных макромолекул: *ДНК, РНК и белков*.

Основные данные по ингибированию макромолекулярных синтезов получены на микроорганизмах. Сходные закономерности обнаруживаются также у простейших, животных клеток в культуре и клеток кожи *in vivo*.

Спектры действия подавления синтеза ДНК, РНК и белка, включая индукцию ферментов, у микробов носят в основном нуклеиновый характер (рис. 54). Однако некоторые данные указывают на активное участие в этом процессе *не только нуклеиновых кислот, но и белка*. Например, в спектрах действия подавления макромолекулярных синтезов у *M. radiodurans* проявляется белковый компонент, а спектры действия инактивации синтеза полифенилаланина рибосомами *in vitro* имеют как нуклеиновый (260 нм), так и белковый (280 нм) максимумы.

Обычно фоточувствительность синтеза ДНК у микроорганизмов (штаммы *E. coli*), определяемая по дозам облучения, выше, чем фоточувствительность синтеза РНК и белка.

В зависимости от видовой принадлежности и физиологического состояния биологических объектов взаимоотношения между скоростью подавления синтезов РНК и белка могут быть различными, причем чаще всего более чувствителен синтез РНК. Фоточувствительность биосинтезов различных видов РНК *возрастает в ряду*

т-РНК — *и*-РНК — *р*-РНК. Известно также, что рибосомальная РНК 23S более чувствительна, чем 16S или 4S.

В свою очередь синтез различных ферментов в клетке одного и того же микроорганизма и идентичных ферментов в разных микроорганизмах подавляется с неодинаковой эффективностью. Например, индукционный синтез ферментов подавляется раньше, чем суммарный синтез белков.

Синтез ДНК и белка ингибируется по *одноударному*, РНК — по *двухударному* механизму, что может быть объяснено необходимостью повреждения двух участков ДНК для прекращения транскрипции.

В 1964 г. Сетлоу предположил, что ДНК-полимераза останавливается в ходе синтеза дочерией комплементарной цепи около каждого пиримидинового димера. Это предположение косвенно подтверждается данными Раппа и Ховард-Фландерса, обнаружившими на штамме *E. coli* K-12 *uvr* A6, лишенном ферментов темновой репарации, параллелизм между числом димеров и уменьшением скорости синтеза ДНК, что позволило оценить время задержки ДНК-полимеразы у каждого димера в 10 с. В облученных клетках синтезируется не целая ДНК, а ее укороченные фрагменты, длина которых коррелирует со средним расстоянием между димерами в цепи материнской ДНК. Такая же фрагментация характерна и для синтеза *и*-РНК и *р*-РНК у *E. coli* B₁, B/g и B_{s-1}. Фрагментация РНК обусловлена отрывом РНК-полимеразы от матрицы в димерсодержащих участках.

Аналогичным образом облучение влияет на синтез белка. Обнаруживаются укороченные полипептидные цепи белков и возникают изменения общего заряда ма-



Рис. 54. Спектры действия ингибирования синтеза белка и РНК (1) и поглощения нуклеиновых кислот (2) (Hanawalt P., Setlow R., 1960)

кромолекулы и ее конформации. Это следует, например, из данных о способности фрагментов полипептидной цепи диссоциировать при более низких концентрациях соли, чем обычный белок. Подчеркнем, что *фрагментация белка отражает фрагментацию и-РНК*.

Общее торможение синтеза белка приписывается замедлению синтеза и-РНК и белка рибосомами вследствие потери терминальных кодонов и-РНК при фрагментации. Это затрудняет своевременный отрыв рибосомы с полипептидной цепью от матрицы. Торможение синтеза белка может быть обусловлено также задержкой синтеза рибосом. Характерно, что при малых дозах (десятки Дж/м²) преобладает «рибосомальный», а при больших (сотни Дж/м²) — матричный (и-РНК) эффекты подавления.

Большие дозы облучения, приводящие к накоплению фотопродуктов в самой и-РНК, приостанавливают трансляцию у каждого места повреждения, о чем говорит прогрессирующее по градиенту уменьшение скорости синтеза различных белков полицистронного гена по мере удаления от оператора. Подобная ситуация отмечена для gal- и lac-оперонов *E. coli*.

К сожалению, на вопрос первостепенной важности, подавление какого макромолекулярного синтеза приводит к гибели или ингибированию деления клеток, еще ответить нельзя. Основной причиной создавшейся неопределенности являются трудности методического характера. Во всех работах анализируются биосинтезы не определенных видов макромолекул ДНК, РНК и белка, а их совокупность («вал»). Вместе с тем хорошо известно, что прекращение синтеза лишь одного ключевого белка (при продолжении всех остальных биосинтезов) может привести к гибели или подавлению деления клеток. Интерпретация данных по ингибированию УФ-лучами синтеза ДНК затруднена также вследствие гетерогенности клеток в культуре. При этом гетерогенность популяции увеличивается в ходе облучения. Именно поэтому Смит и Хэнеуолт условно разделили клетки по их ответу на облучение на три класса: 1) образующие колонии и синтезирующие ДНК (эффективная репарация); 2) не образующие колонии, но синтезирующие ДНК; 3) не образующие колонии и не синтезирующие ДНК.

Ярким примером отсутствия прямой связи между подавлением клеточного деления и синтезом ДНК (равно, как и других макромолекул) могут служить некоторые штаммы *E. coli*, у которых облучение ингибирует деление клеток, но существенно не влияет на все макромолекулярные синтезы. При этом возникают длинные (до 1 мм) аномальные полиплоидные клетки-филаменты, содержащие большое количество ядроподобных структур нуклеоидов. Способность образовывать филаменты свойственна штаммам бактерий, которые содержат гены *fil*⁺ (локализованный между *try* и *gal*) и *lon* (локализованный между *gal* и *lac*). Спектр действия филаментообразования имеет нуклеиновый характер, а сам эффект вызывается малыми дозами облучения. Характерно, что УФ-облучение в этом случае, существенно не тормозя синтеза ДНК, РНК, белков и биомассы клеток, препятствует клеточному делению — образованию мембранных перегородок в филаменте. Причиной филаментообразования являются, по-видимому, димеры пиримидиновых оснований, о чем свидетельствует способность видимого света частично снимать эффект (фотореактивация). По данным Виткин, за филаментообразование ответственно повреждение гена-регулятора, что приводит к прекращению синтеза репрессора, блокирующего оперон В, причем снятие блока (индукция оперона) запускает синтез белка — ингибитора митозов.

Рекомендуемая литература

Смит К., Хэнеуолт Ф. Молекулярная фотобиология. Процессы инактивации и восстановления. М., 1972.

Brunschede H., Bremer H. Protein synthesis in *E. coli* after irradiation with UV-light.— J. Molec. Biol., 1969, 41, 25.

Hanawalt P., Setlow R. Effect of monochromatic UV-light on macromolecular synthesis in *E. coli*.— Biochim. et biophys. acta, 1960, 41, 283.

Michalke H., Bremer H. RNA synthesis in *E. coli* after irradiation with UV-light.— J. Molec. Biol., 1969, 41, 1.

Rapp W., Howard-Flanders P. Discontinuities in the DNA synthesized in excision defective strain of *E. coli* following UV-irradiation.— J. Molec. Biol., 1968, 31, 291.

Глава XVII. РЕПАРАЦИЯ ФОТОПОВРЕЖДЕНИЙ В КЛЕТКЕ

Вследствие чрезвычайно важной роли генетического аппарата в ходе эволюционного развития в клетке выработались и наследственно закрепились специальные механизмы, направленные на устранение летальных и мутационных повреждений ДНК, вызванных различными внешними или внутренними физическими и химическими факторами, в том числе и ультрафиолетовой радиацией. Естественно, что эффективность работы этих механизмов определяет фоточувствительность клеток и организмов.

Из изученных к настоящему времени механизмов восстановления генетических структур будут рассмотрены только те, эффективность которых контролируется самой клеткой. Это фотореактивация, фотопротекция и темновая репарация. Меньшее значение имеют такие процессы, как спонтанный распад фотопродуктов, прямое фоторасщепление пиримидиновых димеров и другие.

1. ФОТОРЕАКТИВАЦИЯ

Открытое И. Ф. Ковалевым и Кельнером явление фотореактивации заключается в *снижении эффективности действия ультрафиолетовых лучей при пострадиационном облучении клеток видимым светом*. Фотореактивация описана у вирусов (в клетке хозяина), бактерий, грибов, водорослей, клеток растений и животных, т. е. практически у всех биологических объектов.

Описано три типа фотореактивации. Наиболее изучена и универсальна *фотореактивация I, осуществляющаяся по одноударному механизму с высоким квантовым выходом (10^{-1} —1)*. Зависимость скорости фотореактивации от интенсивности видимого света описывается кривой Михаэлиса — Ментена, характерной для зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата. Скорость фотореактивации увеличивается также с повышением температуры. Фотореактивация наблюдается не только в клетках, но и при добавлении к поврежденным структурам экстрактов из дрожжей или *E. coli*. Оказалось, например, что экстракты из дрожжей усили-

вают фотореактивацию самых различных клеток и вызывают элиминацию повреждений у вирусов и трансформирующей ДНК *in vitro*. По данным Сетлоу, у трансформирующей ДНК в растворе фотореактивируется около 90% биологически активных повреждений.

Максимум спектра действия фотореактивации I варьирует от 385 нм у дрожжей до 436 нм у *Streptomyces griseus*.

В 1958 г. Рупертом был выделен из дрожжей, а в 1966 г. Мухамедом очищен так называемый фотореактивирующий фермент, получивший в последние годы название фототиазы. Однако самый тщательный анализ не выявил в его составе компонентов, которые по своим абсорбционным свойствам могли бы формировать спектр действия фотореактивации. Спектр поглощения комплекса фермент — облученная ДНК также сильно отличался от всех зарегистрированных спектров действия фотореактивации.

Немного позднее Сайто и Вербин выделили и очистили фотореактивирующий фермент из водоросли *Anacystis nidulans*. Его молекулярный вес составлял 93 000, а в спектре поглощения обнаруживался длинноволновый максимум при 418 нм, не совпадающий с максимумом 436 нм в спектре действия фотореактивации.

Несмотря на низкое содержание фотореактивирующего фермента в клетках (по подсчетам Харма на одну клетку приходится около 10 молекул фермента), американскому исследователю Уэбину удалось получить достаточные для физико-химического анализа количества фототиазы. По его данным, в состав фермента входят две субъединицы, имеющие молекулярный вес 54 000—60 000 и 82 500. В отличие от дрожжевой фототиазы фермент из *E. coli* содержит только одну полипептидную цепь с молекулярным весом 35 000. Однако, несмотря на высокую степень очистки, ни дрожжевая, ни фототиаза из *E. coli* не обнаруживали ощутимого поглощения в области 320—450 нм.

Указанное противоречие — несовпадение спектров поглощения фототиаз со спектром действия фотореактивации — разрешилось совсем недавно благодаря экспериментам Уэбина и Маддена, обнаруживших в дрожжевых клетках особые флуоресцентные активаторы, содержа-

ние которых точно соответствует количеству фототиазы. В спектре возбуждения флуоресценции этого вещества обнаруживаются максимумы при 280 и 358 нм. Активатор примерно в 2 раза увеличивает эффективность высокоочищенной фототиазы и не оказывает никакого эффекта при добавлении к препаратам энзима, еще не подвергнутым дополнительной очистке. Не исключено, что данный активатор, по всей видимости и являющийся хромофорной группировкой фототиазы, теряется в ходе очистки энзима. Именно поэтому не удавалось обнаружить какого-либо ощутимого поглощения у очищенного фермента в области спектра 320—450 нм.

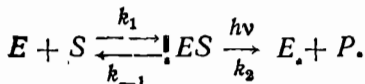
Прямые указания на существование активатора (кофактора) в составе фототиазы получены также Г. Б. Завильгельским. Для получения высокоочищенных препаратов фотореактивирующего фермента им была использована изящная методика, основанная на различии констант связывания фототиазы с субстратом (пиримидиновые димеры в ДНК) и необлученной ДНК. В раствор, содержащий фототиазу, опускалась УФ-облученная пленка, приготовленная из «сшитой» ДНК, при этом фототиаза избирательно комплексовала с пиримидиновыми димерами ДНК. Затем пленка последовательно помещалась в буферные растворы с возрастающей ионной силой. Сначала смывались неспецифически адсорбированные на ДНК белки, а при ионной силе 0,2—0,4 — фототиаза. Высокоочищенный препарат фермента обнаруживал в спектре поглощения кроме белкового (278 нм) дополнительные максимумы приблизительно при 330, 370 и при 418 нм, которые можно было приписать кофактору. Препарат люминесцировал с максимумами спектра флуоресценции при 435 и возбуждения флуоресценции при 355 нм.

Исходя из вышеописанных данных, можно допустить, что фототиазы в клетке находятся в стехиометрическом комплексе с активатором (кофактором) и что свет, поглощаемый активатором, каким-то образом (возможно, через конформационное возмущение фермента или через использование энергии электронно-возбужденного состояния для нужд катализа) увеличивает ферментативную активность в значительно большей степени, чем свет, поглощенный самим ферментом.

Иным образом объясняет несоответствие спектров действия фотореактивации и поглощения фотолиазы американский исследователь Сазерленд. По ее мнению, поглощением в области 320—450 нм обладает не сама фотолиаза и не какая-нибудь слабосвязанная с ней группировка, а комплекс фермента с облученной ДНК. В качестве доказательства этого положения Сазерленд приводит результаты спектрофотометрических измерений, в которых для комплекса облучения фотолиаза+ДНК были зарегистрированы изменения поглощения в области спектра 320—420 нм. В противоположность этому в контрольном варианте опыта (фотолиаза+необлученная ДНК) никаких изменений поглощения обнаружить не удалось.

Как уже упоминалось, фотореактивирующий фермент обладает повышенным сродством к пиримидиновым димерам и его действие сводится к их мономеризации. С наибольшей скоростью мономеризуются димеры тимина, с меньшей — смешанные димеры Ц—Т и Т—У и с еще меньшей — димеры У—У и Ц—Ц. Другие продукты димерной природы, например «споровый» продукт или сшивки ДНК—ДНК и ДНК — белок, не фотореактивируются.

Как и при всякой ферментативной реакции, между ферментом и субстратом (облученной ДНК, или синтетическим полинуклеотидом) в темноте образуется устойчивый комплекс, который может быть выделен путем ультрацентрифугирования или гельфильтрации. Размеры сорбционного центра фермента достаточно велики, поскольку фрагменты политимидиловой кислоты, содержащие менее девяти мономеров, с ним не комплексируют. В отличие от обычных ферментативных реакций каталитический акт в фермент-субстратном комплексе фотореактивирующий фермент — облученная ДНК не протекает без видимого света, т. е. фермент работает в электронно-возбужденном состоянии. При постоянной интенсивности света реакция мономеризации подчиняется кинетическому уравнению Михаэлиса — Ментена:



По данным Харма, для ДНК *E. coli* в клетке $k_1 = 1,1 \times 10^{-6}$ л·моль⁻¹·с⁻¹, $k_{-1} = 1,9 \cdot 10^{-3} \div 1,3 \cdot 10^{-2}$, энергия активации образования фермент-субстратного комплекса равна 11, а его распада — 4,5 ккал/моль.

Принципиальное сходство механизмов фотореактивации *in vivo* и *in vitro* доказывается опытами с мутантами: штамм *E. coli* *phg*⁻, дефектный по фотореактивирующему энзиму, не только сам не обладает способностью к фотореактивации, но и его экстракты лишены этой способности в модельных опытах.

Фотореактивация *второго типа* (фотореактивация II, или непрямая фотореактивация) не насыщается при высоких интенсивностях света и характеризуется спектром действия с максимумом при 340—350 нм. В противоположность фотореактивации I фотореактивация II не зависит от температуры, и клеточные экстракты на свету с длиной волны 340 нм не устраняют повреждения, фотореактивируемые в клетке. Это указывает на *неферментативную природу фотореактивации II*. Характерно, что при фотореактивации II димеры тимина не расщепляются и этот тип фотореактивации, по-видимому, по своему механизму близок к фотопротекции.

Существует несколько рабочих гипотез, исходя из которых пытаются объяснить механизм фотореактивации II. Согласно одной из них, свет с длиной волны 334 нм подавляет рост и деление клеток, создавая тем самым благоприятные условия для работы системы темновой репарации — повышение эффективности выщепления — замещения димеров. Исходя из другой гипотезы, непрямую фотореактивацию связывают с разрушением в клетке хинонов, входящих в состав электронно-транспортной цепи.

Фотореактивация III характеризуется более высокой квантовой эффективностью и спектром действия с максимумом при 313 нм. Как и фотореактивация II, она практически не зависит от температуры и скорости дозы облучения. Эффект увеличения выживаемости при инкубации в жидких средах (*liquid-holding recovery*) при ней не наблюдается. Фотореактивация III также имеет неэнзиматическую природу. По мнению Джаггера, в основе этого процесса лежит *фотолиз урацил-тиминовых аддуктов*, которые выделены из облученных ДНК в растворе и в

клетке, имеют максимум поглощения при 313 нм и эффективно фотолизируются светом.

Необходимо отметить, что фотореактивация всех трех типов может иметь место у различных организмов в самых разнообразных комбинациях. Например, спектр действия фотореактивации *E. coli* (рис. 55) имеет три максимума (313, 350 и 385 нм), соответствующие трем типам фотореактивации, спектр действия фотореактивации *Streptomyces griseus* — два (313 и 436 нм), соответствующие фотореактивации I и II, а у мутантов *S. griseus* RHP-1 и *S. coelicolor* представлена только фотореактивация III.

Для бактериофагов отмечена также ультрафиолетовая или W-реактивация, которая заключается в увеличении выживаемости УФ-облученных фагов в результате повторного облучения коротковолновым ультрафиолетом (250—300 нм) системы фаг — бактерия или даже клетки-хозяина перед инфицированием. По механизму этот процесс отличается как от обычной фотореактивации, так и от темновой репарации и связан, как стало ясно в последнее время, с SOS-репарирующей системой (см. § 3). Показано, например, что и другие воздействия, приводящие к репарируемым повреждениям ДНК, сопровождаются реактивацией фага, аналогичной ультрафиолетовой.

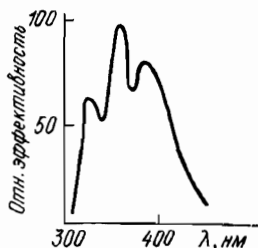


Рис. 55. Спектр действия фотореактивации *E. coli* (Jagger J., 1964)

2. ФОТОПРОТЕКЦИЯ

Фотопротекция — это уменьшение чувствительности к ультрафиолетовому свету после предрадиационного облучения клеток видимым или длинноволновым ультрафиолетовым светом. В результате такого предварительного облучения *E. coli* удается повысить выживаемость бактерий при УФ-облучении с 1 до 40%. В противоположность фотореактивации фотопротекция обнаружена у

ограниченного числа представителей микроорганизмов, простейших и растений и наблюдается даже у тех клеток (мутантов), которые не способны к фотореактивации. Эффект фотопротекции описывается многоударной кривой, не зависит от температуры ($Q_{10}=1,05$) и представляет собой неэнзиматический процесс. Фотопротекция наблюдается при меньших дозах, чем фотореактивация.

Спектр действия фотопротекции представлен достаточно узкой полосой с максимумом, положение которого у различных клеток варьирует от 310 до 340 нм. Природа хромофора, участвующего в этой реакции, не выяснена, как и фотофизические и фотохимические стадии процесса. Обращает на себя внимание параллелизм между величиной эффекта и степенью подавления дыхания и деления клеток при облучении светом. Причиной подавления дыхания и, как следствие, деления может быть обнаруженное фоторазрушение хинонов в клетке, которые, как известно, участвуют в работе электронного каскада. В свою очередь увеличение межмитотического интервала благоприятствует темновым репарационным процессам, в результате которых устраняются фотохимические повреждения ДНК. Подтверждением этого представления является совпадение спектров действия фотопротекции и задержки клеточного деления *E. coli*. Все это позволило некоторым авторам рассматривать фотопротекцию как вариант фотореактивации II.

3. ТЕМНОВАЯ РЕПАРАЦИЯ

Одним из основных путей устранения клеткой опасных для жизни повреждений генома является выработанный в ходе эволюции ферментативный аппарат темновой репарации. Основной принцип работы этого аппарата заключается в удалении (эксцизии) фотохимически поврежденных участков полинуклеотидной цепи с последующей застройкой дефекта нормальными молекулярными компонентами (нуклеотидами). Результат деятельности системы темновой репарации — прогрессирующее во времени уменьшение содержания димеров в ДНК клетки после УФ-облучения, сопровождающееся стехиометрическим ростом концентрации свободных, не включенных в

состав ДНК димеров в цитоплазме. При этом вырезанные пиримидиновые димеры обнаруживаются в кислоторастворимой фракции цитоплазмы. Вещества, ингибирующие работу ферментов темновой репарации, — кофеин, акридиновые красители, липиды — резко повышают фоточувствительность клеток.

Впервые на существование в клетке темновой репарации указали в 1964 г. Сетлоу и Кэрне, Бойс и Ховард-

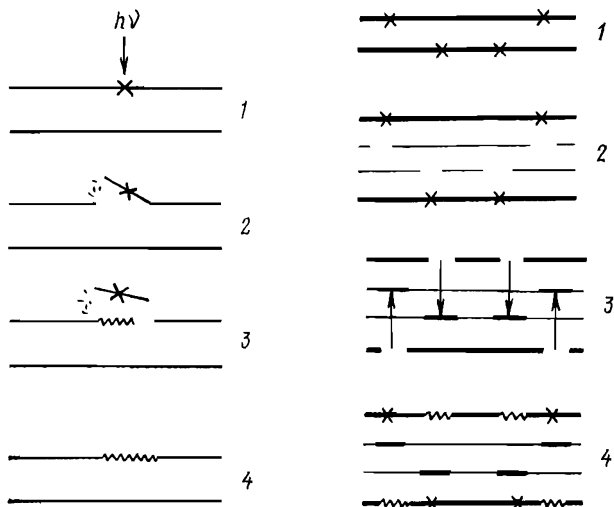


Рис. 56. Эксцизионная темновая репарация:

1 — образование в цепи ДНК фотохимического повреждения; 2 — обнаружение повреждения и разрез нити с помощью коррендонуклеазы II; 3 — вырезание поврежденного фрагмента и комплементарная застройка дефекта с помощью ДНК-полимеразы I; 4 — замыкание концов нити с помощью полинуклеотидлигазы

Рис. 57. Пострепликативная репарация:

1 — образование фотоповреждений в нитях ДНК; 2 — репликация ДНК с образованием в дочерних нитях брешей, комплементарных фотопродуктам; 3 — генетический обмен (заполнение пробелов в сестринских нитях за счет материала материнских нитей); 4 — комплементарная застройка пробелов в материнских нитях

Фландерс. К настоящему времени выявлено, по крайней мере, три основных типа темновой репарации — эксцизионная, пострепликативная и так называемая SOS-репарация. В эксцизионной репарации выделяют четыре основных стадии (рис. 56): 1) обнаружение места по-

вреждения и разрез одной из нитей ДНК; 2) вырезание поврежденного фрагмента полинуклеотидной цепи и расширение бреши; 3) комплементарная застройка дефекта по матрице оставшейся нити ДНК; 4) восстановление целостности полинуклеотидной цепи путем соединения концов. Разрез полинуклеотидной цепи около места повреждения осуществляется с помощью фермента коррендонуклеазы II — продукта генов *uvr A* и *uvr B E. coli*. Вырезание поврежденного фрагмента с последующим расширением бреши и ее застройкой (репаративный синтез) происходит с помощью ДНК-полимеразы I с участием продуктов генов *uvr C*, *uvr E* и *mfd*. Наконец, фермент полинуклеотидлигаза катализирует замыкание концов нити ДНК с восстановлением исходной структуры. Считается, что в процессе эксцизионной репарации могут принимать участие ДНК-полимераза II и ДНК-полимераза III. Некоторые ферменты темновой репарации выделены из микробных клеток и изучены *in vitro*. Генетические методы позволили также получить различные мутанты, дефицитные по отдельным ферментам темновой репарации.

Необходимо подчеркнуть, что описанные стадии темновой репарации происходят *перед репликацией ДНК* (делением клеток) и независимо от нее. Поэтому этот механизм получил также название *предрепликативной* репарации.

Наряду с ним существует и другой механизм — *пострепликативная* репарация (рис. 57), требующая продуктов гена *hcs A*. Основные особенности пострепликативной репарации сводятся к двум моментам: 1) восстановление дефектов происходит не до, а после репликации ДНК: нити, содержащие димеры или другие повреждения, вовлекаются в процесс репликации с возникновением разрывов у дочерней ДНК, расположенных против поврежденных участков материнской комплементарной матрицы; 2) застройка дефектов у дочерней ДНК происходит в ходе рекомбинационных процессов с использованием информации в неповрежденной нити ДНК. Обязательное условие успешной репарации — наличие против бреши интактного участка второй комплементарной нити ДНК.

Таким образом, в ходе пострепликативной репарации

вообще не происходит вырезание димеров или других фотохимических повреждений.

Пострепликативный механизм репарации обеспечивает выживание клетки даже при наличии в ее геноме до 100 пиримидиновых димеров. На основе этого механизма легко объясняется факт сохранения димеров в ДНК у чувствительных к УФ-свету мутантов на протяжении нескольких циклов репликации. Как и предрепликативная, пострепликативная репарация определяется набором специфических ферментов.

Следует отметить, что к настоящему времени в экспериментах с *E. coli* накоплено большое число фактов, которые невозможно объяснить с помощью двух рассмотренных выше механизмов темновой репарации. Например, каким образом происходит восстановление ДНК при повреждении противлежащих участков обеих ее нитей, когда вообще отсутствует матрица для застройки возникающих на их месте брешей. Этот и другие факты стимулировали выдвижение представлений о новом гипотетическом механизме — *SOS-репарации* (*SOS* — международный сигнал бедствия) или индуцибельной репарации с ошибками.

Данный механизм начинает функционировать в тех случаях, когда клетке грозит гибель из-за неспособности обычных, эксцизионной и пострепликативной, систем устранить брешь, противлежащую фотопродукту в комплементарной цепи ДНК, и перекрывающиеся брешки в сестринских цепях. В этих условиях в клетке появляется особый тип ДНК-полимеразы — *SOS-полимераза*, которая способна в противоположность другим ферментам заполнять брешь в дочерней цепи, используя в качестве матрицы материнскую цепь, содержащую димеры. Против димера, как правило, возникают ошибки (мутации). Действительно, в опытах Рэдмана клеточные экстракты *SOS*-культуры *tif-1 E. coli* обладали способностью репарировать УФ-повреждения в синтетических поли-dT-dA-нуклеотидах с ошибочной заменой димеров тимина на гуанин и цитозин. Предполагается, что *SOS-полимераза* может быть продуктом дерепрессирования гена или модифицированной индуцибельным фактором ДНК-полимеразой III. Гипотетическая схема участия *SOS-полимеразы* в эксцизионной и пострепликативной репарации при-

ведена на рис. 58. Следует отметить, что для проявления SOS-репарации необходимы продукты генов *hcs A* и *lex A*. В рамках SOS-гипотезы предполагается, что повреждение ДНК инициирует регуляторный сигнал, приводящий к активации различных функций, направленных на выживание клетки в экстремальных условиях.

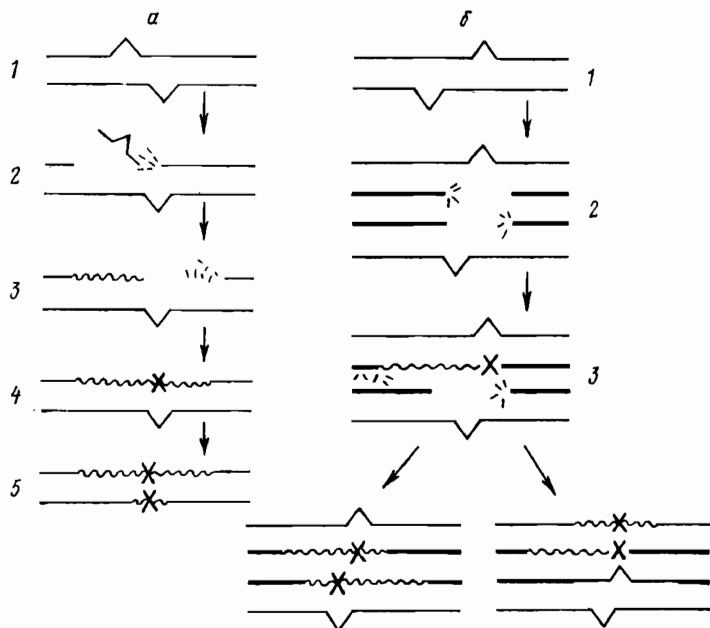
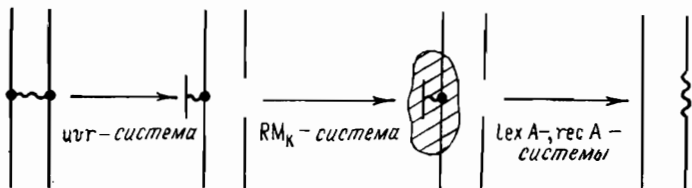


Рис. 58. SOS-репарация в ходе эксцизионного (а) и пострепликативного (б) репарационных процессов (Witkin E., 1977)

а: 1—2 — вырезание продукта и деградация участка цепи ДНК; 2—3 — репарационная репликация останавливается у димера, деградация цепи продолжается; 3—4 — SOS-полимераза застраивает брешь после фотопродукта, при этом возникает мутация; 4—5 — второй фотопродукт элиминируется по типу эксцизионной репарации, обе цепи несут мутантную информацию; б: 1—2 — репликация ДНК и образование перекрывающихся брешей в сестринских цепях; 2—3 — застройка брешь в одной из дочерних цепей с помощью SOS-полимеразы; 3—4' — вторая брешь репарирована в ходе рекомбинации; 3—4'' — вторая брешь также застраивается с помощью SOS-полимеразы

С участием SOS-системы осуществляется и репарация межнитевых сшивок ДНК, относящихся к высоколетальным повреждениям. Г. Б. Завильгельским показано, что межнитевые сшивки в ДНК плазмид, фагов и бак-

терий репарируются по двум механизмам в зависимости от количества геномов, содержащихся в клетке. Схематично репарация сшивки в одиночном геноме может быть представлена так:



На первом этапе происходит выщепление плеча сшивки ферментами *uvr*-системы — системы эксцизии, на втором — защита однотожевого участка от действия нуклеаз с помощью фермента рестрикции-модификации (*RM_k*), который в обычных условиях обеспечивает клетке способность узнавать и разрушать чужеродную ДНК, на третьем — заполнение брешы в ходе синтеза *de novo* при помощи продуктов генов *hcs A* и *lex A*. Если же в клетке представлен второй геном, неповрежденный в данном сайте, то заполнение брешы идет рекомбинационным путем, контролируемым продуктами гена *hcs A*.

Активность и согласованность работы специфических ферментов темновой репарации определяет эффективность всей системы в целом, которая сильно варьирует у различных клеток. Например, у некоторых фоторезистентных штаммов *E. coli* репарируется 90—98% повреждений, а у клеток человека в культуре (HeLa) — только 40%. Известны также микроорганизмы, дефектные по ферментам системы темновой репарации и поэтому обладающие повышенной фоточувствительностью.

Одновременное повреждение локусов ДНК, ответственных за синтез ферментов темновой репарации (*uvr*⁻) и рекомбинации (*hcs*⁻) у двойных мутантов, приводит к столь резкому повышению фоточувствительности ($LD_{37}=0,02$ Дж/м²), что клетка гибнет при образовании лишь одного пиримидинового димера.

К настоящему времени получено и классифицировано большое количество мутантов с генетическим повреждением структурных цистронов, контролирующих синтез различных ферментов репарирующей системы. Их ис-

пользование в значительной мере способствовало выяснению внутренних механизмов темновой репарации.

Необходимо отметить, что разнообразные пострадиационные воздействия, препятствующие репликации ДНК и делению клеток — длительное (несколько часов) выдерживание в средах, лишенных источников полноценного питания (вода, буфер, физиологический раствор, синтетические среды без глюкозы или азотистых веществ), добавление ингибиторов макромолекулярных синтезов и дыхания и т. д., снижают степень биологического повреждения их благодаря созданию оптимальных условий для работы системы темновой репарации.

Система темновой репарации клетки-хозяина устраняет также фотохимические повреждения ДНК бактериофагов.

С другой стороны, бактериофаги Т2, Т4, Т6 не восстанавливаются системой темновой репарации клетки-хозяина, но их геном содержит специальные гены, определяющие синтез в клетке-хозяине особых репарирующих ферментов.

Наконец, у вирусов описано явление неспецифической репарации — множественной и перекрестной реактивации, прямо не связанной с системой темновой репарации. Обнаруженная Лурия *множественная реактивация* заключается в восстановлении жизнеспособности фагов при инфицировании клетки большим числом убитых ультрафиолетовым светом фагов, когда из инактивированных фаговых частиц образуется полноценное потомство. Под *перекрестной реактивацией* понимают восстановление жизнеспособности убитого фага при множественном инфицировании клетки этим фагом и другим, необлученным, отличающимся от первого своим геномом. Это явление нередко называют *«спасением маркеров»*. В основе множественной и перекрестной реактивации лежит реконструкция интактной ДНК из неповрежденных фрагментов нескольких молекул ДНК фагов в ходе генетической комплементации и рекомбинации.

Рекомендуемая литература

Белогуров А. А., Завильгельский Г. Б. Участие системы рестрикции «К» в репарации межнитевых сшивок ДНК. — Докл. АН СССР, 1977, 235, 208.

Завильгельская Н. Е., Завильгельский Г. Б. Фото-реактивирующий фермент из дрожжей: выделение и физико-химические свойства.— В сб.: Биологическое действие УФ-излучения. М., 1975, с. 84.

Завильгельский Г. Б., Парибок В. П. Молекулярные механизмы действия УФ-излучения на клетку.— В сб.: Ультрафиолетовое излучение, вып. 5. М., 1971, с. 5.

Смит К., Хэнеуолт Ф. Молекулярная фотобиология. Процессы инактивации и восстановления. М., 1972.

Cleaver J. E. Repair processes for photochemical damage in mammalian cells.— *Adv. Radiat. Biol.*, 1974, 4, 1.

Grossman L. Enzymes involved in the repair of DNA.— *Adv. Radiat. Biol.*, 1974, 4, 77.

Sutherland J. C. Photophysics and photochemistry of photo-reeactivation.— *Photochem. and Photobiol.*, 1977, 25, 435.

Witkin E. UV-mutagenesis and inducible DNA repair in *E. coli*.— *Bacteriol. Rev.*, 1976, 40, 869.

Глава XVIII. МУТАЦИОННЫЕ И РЕКОМБИНАЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ

1. МУТАЦИИ

В наиболее общей форме мутации — это наследуемые качественно новые изменения генетического аппарата, связанные с возникновением иной нуклеотидной последовательности в ДНК. Прежде чем перейти к рассмотрению фотобиологических аспектов мутагенеза, целесообразно привести краткую классификацию мутаций и некоторые сведения из терминологии.

Различают крупные хромосомные перестройки (выпадение, перемещение на новое место или инверсия на 180° значительных фрагментов хромосом) и точечные мутации. Именно последние представляют наибольший интерес для фотобиологии. При точечных мутациях происходит замена одного из оснований в ДНК на другое, выпадение (делеция) или вставка одного из нуклеотидных остатков. Замена пуринового основания на пуриновое и пиримидинового — на пиримидиновое называется транзцией, а пуринового на пиримидиновое или наоборот — трансверзией. Следствием и транзаций и трансверзий может быть: 1) образование бессмысленных кодонов, не кодирующих аминокислоты УАГ (амбер-мутация), УАА (охра-мутация) и УГА. Эти три типа мутаций называются нонсенс-мутациями и приводят к прерыванию синтеза либо и-РНК, либо белка; 2) изменение смысла кодона, приводящего к включению в белок неверной аминокислоты (миссенс-мутация).

Выпадение и вставки оснований приводят к сдвигу чтения генетического кода на одну букву, в результате чего первичная структура

белка резко меняется — мутация со сдвигом рамки. Сдвиг рамки может сопровождаться возникновением в цепи ДНК бессмысленных кодонов. Последствия мутаций со сдвигом рамки могут быть частично или даже полностью устранены второй мутацией со сдвигом рамки, восстанавливающей правильность чтения букв,— обратные или супрессорные мутации.

Частота мутаций — отношение числа мутировавших к числу выживших клеток. Скорость мутационного процесса — число мутаций на один цикл репликации ДНК в клетке.

Ультрафиолетовый свет является одним из естественных мутагенных факторов. Наибольшей мутагенной активностью обладает свет с длиной волны менее 300 нм. Мутагенное действие видимого света (с очень низким квантовым выходом), как правило, зависящее от кислорода, по-видимому, в большинстве случаев обусловлено фотодинамическим эффектом. Свет с длиной волны 300 нм, обладающий слабой бактерицидной активностью, мутаций не вызывает.

Индукцированные светом мутации возникают у вирусов, микроорганизмов, одноклеточных растений и животных, а также клеток и культур тканей высших растений и животных. При надежной оптической экранировке половых клеток высших растений и животных прямой фотомутагенез становится практически невозможным. Например, при УФ-облучении взрослых дрозофил только 0,1% квантов биологически активного света достигают зародышевых клеток. Однако не исключаются и косвенные мутации, вызываемые фотохимическими продуктами, переносимыми между клетками организма (химический мутагенез). Выявлены такие штаммы бактерий, у которых при облучении УФ-светом, обладающим эффективным летальным действием, мутации практически не наблюдаются. Наряду с мутациями ультрафиолетовый свет вызывает различного типа хромосомные аберрации (разрывы, делеции и транслокации хромосом).

Описано три типа спектров действия фотомутагена: 1) чисто *нуклеиновый* (ДНК) с максимумом при 260—265 нм (рис. 59); 2) чисто *белковый* с максимумом при 280 нм; 3) *смешанный* спектр с нуклеиновыми и белковыми компонентами. Наиболее часто встречаются спектры действия первого и третьего типов.

Для некоторых биологических тест-объектов (об-

ратные мутации чувствительного к стрептомицину штамма *E. coli* В/г) отмечается линейность между частотой мутации и дозой облучения, для других (например, летальные мутации у дрозофилы) — экспоненциальность. Как правило, эффективность УФ-света нелинейно зависит от его дозы (рис. 60): она снижается

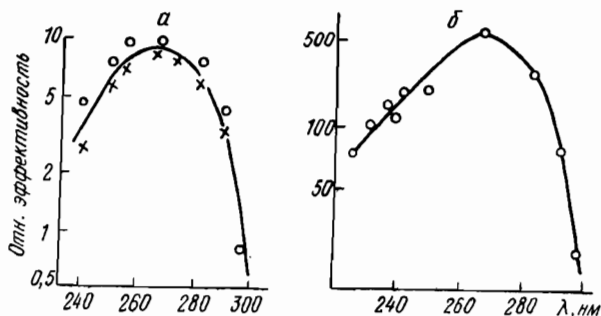


Рис. 59. Спектры действия гибели (X), мутации (O) дрожжей (a) и мутагенеза *E. coli* H/r 30R (б) (Raut C., Simpson W., 1955):

при слишком малых или больших дозах. При этом нелинейность, по данным Свенсона и Штадлера, имеет неодинаковый характер для различных длин волн ультрафиолетового света. У многих микроорганизмов зависимость отношения числа мутаций к числу выживших клеток описывается кривой следующего типа (см. рис. 60): рост — плато (максимум) — падение («завал»). Подобные кривые получены для бактериофагов, насекомых и высших растений. Иногда, однако, «завала» кривой не происходит даже при очень больших дозах (100—500 Дж/м²).

Появление максимума может быть обусловлено большей вероятностью гибели мутированных клеток или увеличением вероятности реверсии мутированных клеток к дикому состоянию. Согласно второй гипотезе, в основе реверсии мутантов к дикому состоянию может лежать, например, усиление репарационных процессов вследствие задержки деления или снятия генетического дефекта супрессорными мутациями. Если бы появление максимума было обусловлено увеличением вероят-

ности реверсии мутированных клеток к дикому состоянию, то при больших дозах облучения, при которых выход мутантов максимален, должны были наблюдаться явные аномалии в кривых выживаемости. Такие аномалии, однако, не наблюдаются в действительности.

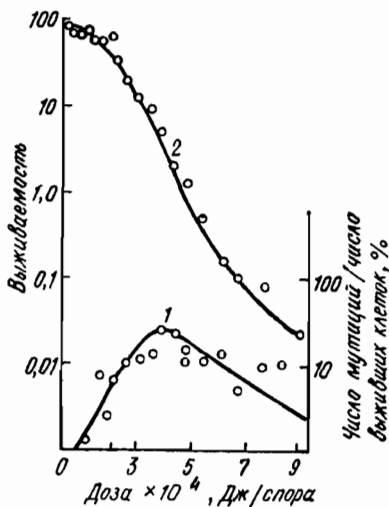


Рис. 60. Зависимость частоты мутаций (1) и выживаемости (2) спор грибов от дозы облучения ($\lambda = 265$ нм) (Pamper S., Atwood K., 1955)

В связи с этим представляется более обоснованной первая гипотеза.

Увеличение вероятности гибели мутированных клеток может быть вызвано: 1) ростом вероятности гибели несущих мутации клеток под действием последующих фотоповреждений ДНК, поскольку мутанты обладают повышенной фоточувствительностью; 2) увеличением гибели мутированных клеток через взаимодействия ядра с цитоплазмой, поврежденной большими дозами УФ-света; 3) гетерогенностью клеточной популяции; 4) возникновением некритических повреждений ДНК, препятствующих миграции энергии к критическим му-

тагенным участкам полинуклеотидной цепи.

Первое, третье и четвертое предположения легко уязвимы для критики. Например, при справедливости первого предположения оставшаяся после первого облучения популяция клеток (отличная по геному от исходной) обладала бы при повторном облучении повышенной фоточувствительностью, что не подтверждается экспериментом. К настоящему времени следует считать наиболее обоснованным объяснение максимума за счет взаимодействия мутантного ядра с дефектной цитоплазмой. Действительно, отмечается повышенная смертность мутантов в период их «темновой» жизни.

Мутагенная фоточувствительность, как правило, существенно зависит от всех факторов, которые были рассмотрены в гл. XV. При мутагенном эффекте, как и при летальном, температура облучения практически не существенна, а пострадикационная важна. Эффективность мутагенного действия ультрафиолетового света мало зависит от концентрации кислорода в среде. Мутации у фагов вызываются при облучении их не только внутри клетки-хозяина на различных стадиях инфекционного цикла, но и вне ее — *in vitro*.

Что же известно о молекулярных механизмах фото-мутагенеза? Судя по спектрам действия, первичные фотофизические и фотохимические процессы локализованы главным образом в самой ДНК, хотя на основании косвенных данных высказывается предположение о возможности непрямого мутагенеза через фотообразование в клетке химических мутагенов, модифицирующих геном.

Значительный вклад в мутагенез вносит основное повреждение ДНК — образование пиримидиновых и прежде всего тиминовых димеров. Аргументами в пользу этого являются следующие факты: 1) обнаружение димеров в мутированных клетках; 2) сходство спектров действия мутагенеза фагов со спектром поглощения тимидина; 3) фотореактивируемость предмутационного состояния: сравнение штаммов phg^+ и phg^- показало, что около 90% стрептомициновых и «прототрофных» мутаций обусловлено димерами; 4) параллелизм между снижением частоты мутаций и количеством димеров у дефицитных по ферментам темновой репарации мутантов *E. coli* в последующих после УФ-облучения генерациях родительских клеток; 5) возникновение мутаций у фага T4 в результате обменно-резонансной триплет-триплетной миграции энергии от дериватов ацетофенона к тимину — сенсibilизированные мутации транзиций и сдвига рамки; 6) кодирование Г—У и У—У возникающими при УФ-облучении ДНК урациловыми димерами согласно опытам по синтезу полипептидов *in vitro*.

Вместе с тем ряд экспериментальных фактов указывает на то, что за возникновение мутаций ответственны не только пиримидиновые димеры, но и другие

фотоповреждения ДНК. Это означает, что тиминовые димеры инициируют только определенную часть возникающих при УФ-облучении мутаций. К мутациям могут приводить и следующие фотохимические повреждения ДНК. 1. Гидратация цитозина с последующей заменой его через стадию оксиметилурацила в ходе репликации на тимин (транзигия), о чем свидетельствуют рост частоты мутаций у некоторых микроорганизмов с повышенным содержанием гуанина и цитозина и отсутствие ревертантов фагов после обработки гидроксиламином. Так, например, расчет, проведенный Г. Б. Завильгельским, показал, что у фага ϕ_d вклад нелетальных гидратов цитозина в мутагенез примерно равен удвоенному вкладу димеров тимина и всех остальных летальных повреждений. Известно также, что фотопродукты цитозина читаются как тимин или, возможно, как гуанин. 2. Сшивки ДНК — белок, являющиеся серьезным препятствием для ферментативной репликации ДНК. 3. Фототаутомеризация оснований, приводящая к замене пар аденин—тимин на гуанин—цитозин. Совершенно очевидно, что участие тех или иных фотохимических повреждений ДНК в мутагенезе определяется видом организма и, следовательно, особенностями строения его ДНК. Например, в ДНК фага T4 в противоположность фагу ϕ_d гидраты цитозина вообще не образуются, так как оксиметилцитозин, свойственный фагу T4, не фотогидрируется.

Фотохимические повреждения могут реализоваться в мутационные изменения генома (миссенс-мутации, нонсенс-мутации, мутации сдвига рамки, супрессорные мутации) за счет возникновения ошибок в ходе следующих основных процессов: заполнения бреши ДНК при эксцизионной репарации; заполнения бреши ДНК при пострепликационной рекомбинации; перескока ДНК-полимеразы через неэлиминированное повреждение при репликации.

В последние годы получили широкое распространение представления, развиваемые в работах Виткин, согласно которым мутации возникают только благодаря ошибкам в ходе работы SOS-репарирующей системы (см. гл. XVI). Показано, в частности, что УФ-мутабильность связана с продуктами генов $hcs A^+$ и $lex A^+$

и прямо коррелирует с другими SOS-функциями: индуцибельностью λ -профага и W -реактивацией. Действительно, у двойных мутантов $hcs A^-$ и $lex A^-$ УФ-свет практически не вызывает мутаций.

Итак, мутабельность клетки определяется не только количеством или природой фотоповреждений, но и параметрами репарирующих повреждение систем и в первую очередь системы SOS-репарации. Именно эта точка зрения наиболее популярна в настоящее время.

Если УФ-свет вызывает мутацию гена, ответственного за биосинтез ДНК-полимеразы или других ферментов репарирующей системы, то возникшие мутантные клетки характеризуются высокой частотой спонтанных мутаций, которые не связаны с действием внешних или внутренних мутагенных факторов, а обусловлены ошибками в ходе репликации. В связи с этим в генетике возникло представление о гене, контролирующем частоту естественных мутаций,— гене-мутаторе.

Как и другие дефекты ДНК, мутационные повреждения фотореактивируются и элиминируются ферментами темновой репарации. У некоторых штаммов *E. coli* фотореактивируются только те повреждения, которые вызываются малыми дозами ультрафиолетового света. У мутантов *E. coli*, дефектных по ферментам темновой репарации, повышенная мутабельность сохраняется на протяжении четырех поколений, прогрессивно уменьшаясь в каждой последующей генерации. По мнению Виткин, почти все УФ-индуцированные мутации реализуются до второй пострадиационной репликации ДНК.

В заключение необходимо отметить, что одни и те же повреждения ДНК вызывают и гибель, и мутации биообъектов, а различные повреждения могут приводить примерно к одному и тому же спектру мутаций.

2. РЕКОМБИНАЦИЯ

Под термином «рекомбинация» у бактерий подразумевается образование новых комбинаций генов во время полового размножения. После конъюгации мужской и женской клеток ДНК донора переходит в клетку ре-

ципиента, где и происходит обмен участками полинуклеотидной цепи ДНК — генами. Интеграция половой эписомы донора в хромосому хозяина осуществляется системой ферментов рекомбинации. Поэтому мутанты $гес^-$, дефектные по этим ферментам, к рекомбинации не способны.

По данным Хейса, при облучении мужских штаммов бактерий (F^+) дозами ультрафиолетового света, соответствующими 70% выживаемости, наблюдается резкое (примерно в 50 раз) увеличение частоты образования рекомбинантов при скрещивании с необлученными женскими штаммами. Спектры действия рекомбинационных эффектов не измерялись. Показано только, что свет, адресованный нуклеиновым кислотам ($\lambda = 260$ нм), повышает частоту рекомбинаций у *E. coli*, в то время как свет, адресованный белку ($\lambda = 289$ нм), приводит к гибели клеток с понижением частоты рекомбинаций. Следовательно, более вероятно, что акцептором биологически активного света является ДНК, а не белок.

В многочисленных экспериментах показано, что, как и для других генетических эффектов (мутация, индукция профага), зависимость частоты рекомбинации от дозы ультрафиолетового света описывается куполообразной кривой с максимумом. Подобная зависимость скорее всего отражает наложение двух одноударных процессов: активацию хромосомы (F^+) мужской клетки при включении в нее половой эписомы (интеграция) и предотвращение переноса активированной хромосомы. Ингибирование переноса хромосомы донора к акцептору является следствием либо прямых, либо косвенных разрывов полинуклеотидной цепи, возникающих при темновой репарации. Молекулярные механизмы активации хромосомы (F^+), приводящей к увеличению частоты рекомбинаций, не выяснены. Предполагается, что этому способствуют односторонние разрывы ДНК половой эписомы. Увеличение частоты рекомбинаций наблюдается только у штаммов с неинтегрированной половой эписомой. У остальных штаммов рекомбинация подавляется по одноударному механизму в результате торможения переноса ДНК.

Рекомендуемая литература

- Соффер В. Н. Молекулярные механизмы мутагенеза. М., 1969.
Giese A. UV-action spectrum in perspective: with special referring to mutation.— *Photochem. and Photobiol.*, 1968, 8, 527.
Meistrich M., Shulman R. Mutagenic effect of sensitized irradiation of bacteriophage T4.— *J. Molec. Biol.*, 1969, 46, 157.
Witkin E. UV-mutagenesis and inducible DNA repair in *E. coli*.— *Bacteriol. Rev.*, 1976, 40, 869.

Глава XIX. ЛИЗОГЕНИЯ

Лизогения — это наследственная способность некоторых микробов продуцировать фаг без предварительного инфицирования их этим фагом. У лизогенных микроорганизмов фаговая ДНК (профаг) встроена в нить ДНК хозяина. Как правило, профаг включен в бактериальную хромосому в определенном ее участке и реплицируется при размножении клеток. Иногда в геном хозяина вовлечено несколько профагов. Такие организмы называются полилизогенными. Обычно структурные цистроны профага репрессированы особым белком, блокирующим специфическую область генома фага и предотвращающим транскрипцию его генов. Индукция профага происходит спонтанно или под действием различных факторов: фаговая ДНК отделяется от ДНК хозяина, профаг превращается в вегетативный фаг, после интенсивного размножения которого клетка лизируется и зрелый фаг выходит в окружающую среду.

Наиболее универсальным индуцирующим агентом является УФ-свет. Чувствительность клеток к УФ-индукции профага в большой степени зависит от физиологического состояния микробной клетки и условий внешней среды: температуры, химического состава, pH и др. Например, индукция облегчается при наличии в питательной среде некоторых аминокислот (*l*-лейцин, *l*-изолейцин, *l*-валин и др.). Профаг *Bact. megatherium* 899 легко индуцируется в казеиново-дрожжевой, но не в синтетической среде. Образованию фага предшествует сравнительно продолжительный латентный период. Для индукции профага необходимы, как правило, меньшие дозы ультрафиолета, чем для гибели клеток хо-

зав. Обнаружена также прямая коррелятивная зависимость между способностью различных штаммов *E. coli* к мутациям и индукции профага.

Кривая зависимости степени индукции профага *E. coli* К-12 (λ) от дозы ($\lambda = 254$ нм) имеет четко выраженный максимум, который возникает вследствие наложения двух одновременно протекающих процессов: индукции профага и его гибели (рис. 61).

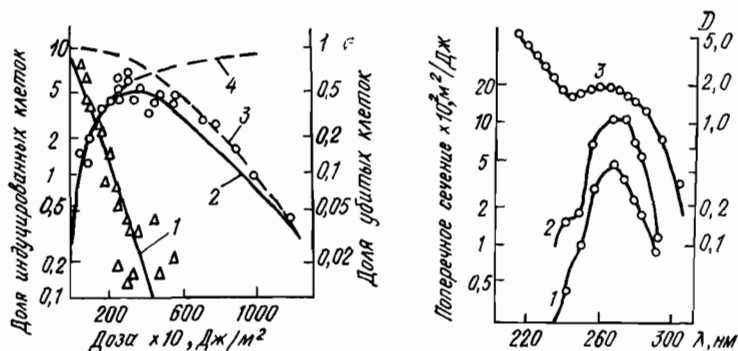


Рис. 61. Дозные кривые инактивации *E. coli* К-12 (1), индукции профага (2), инактивации профага (3), истинной индукции профага (4) (Franklin R., 1954)

Рис. 62. Спектры действия индукции профага *E. coli* К-12 (1), гибели клеток (2) и спектр поглощения *E. coli* (3) (Franklin R., 1954)

Суммарная кривая описывается уравнением

$$N/N_0 = (1 - e^{-s_1 D}) [1 - (1 - e^{-s_2 D})^m],$$

где N_0 и N — общее число клеток и число индуцированных клеток соответственно; s_1 и s_2 — поперечные сечения индукции и гибели профага; D — доза; m — множественность удара.

Первый член уравнения описывает индукцию, второй — гибель профага. С учетом гибели профагов истинная индукция описывается кривой с насыщением. Следовательно, действию ультрафиолета подвергаются две мишени, причем поперечное сечение повреждения одной из них зависит от физиологического состояния клеток.

Спектр действия индукции профага *E. coli* K-12 (λ) имеет нуклеиновую природу без белкового «плеча» при 280 нм, характерного для спектра действия гибели клеток (рис. 62). Следовательно, *акцептором биологически активного света служит ДНК*. Вполне вероятно, что индукция профага обусловлена пиримидиновыми димерами ДНК, поскольку эффективность ультрафиолетовой индукции лизогенных микробов снижается при фотореактивации и фотопротекции длинноволновым УФ-светом.

К изменению активности генома могут приводить фотоповреждения как в ДНК хозяина, так и в ДНК профага. В пользу локализации фотоповреждений в ДНК хозяина свидетельствуют следующие факты: 1) у полилизогенных культур индуцируется сразу несколько различающихся по геному профагов; 2) профаг индуцируется у лизогенного донора при скрещивании его с нелизогенным, но УФ-облученным реципиентом; 3) лизогенные по фагу λ мутанты *E. coli*, дефектные по способности к рекомбинации (*гес*⁻), теряют способность к индукции профага, приобретая ее вновь после введения в геном клетки *гес*⁺-маркера с помощью трансдукции (переноса гена от одной бактериальной клетки к другой с помощью фага); 4) изменение генома *E. coli* K-12 (λ) (увеличение «полярных шапочек», т. е. количества ДНК) после индуцирующего УФ-облучения.

В свою очередь на поглощение биологически активного света ДНК профага указывает возможность получения его мутантов (*ind*⁻), теряющих способность к индукции. Показано также, что индукции предшествует синтез на матрице ДНК особого фермента интегразы, при блокировании которого левомицетином индукция резко тормозится.

По данным Кэмпбелла и Киллена, переход профага в вегетативный фаг, заключающийся в разрыве, по крайней мере, двух ковалентных связей в полинуклеотидной цепи, представляет собой ферментативный процесс с участием интегразы и концевых ферментов. Непосредственной причиной перехода может быть активация нуклеаз, расщепляющих полинуклеотидную цепь, или активация субстрата — ДНК. В первом случае ак-

тивация достигается прекращением синтеза репрессора. Действительно, Сато и Мацушира с сотр. показано, что через 20—30 мин после облучения репрессор исчезает. В дальнейшем снимается репрессия с цистронов ДНК фага, ответственных за синтез фаговых белков. Остается неясным, однако, основной вопрос: каким образом свет модифицирует активность генома, иницируя тем самым цепь вторичных биосинтетических и ферментативных реакций?

Наиболее популярными в настоящее время являются представления об участии системы SOS-репарации в индукции профага (см. гл. XVII).

В заключение следует отметить, что УФ-свет, используемый в начале латентного периода, способствует обратному процессу фаг → профаг при инфицировании бактерий.

Рекомендуемая литература

- Габрилович И. М. Лизогения. Минск, 1970.
Раутенштейн Я. И. Бактериофагия. М., 1955.
Franklin R. Action spectrum for UV-induction of lysis in *E. coli* K-12.— *Biochim. et biophys. acta*, 1954, 13, 137.
Witkin E. UV-mutagenesis and inducible DNA repair in *E. coli*.— *Bacteriol. Rev.*, 1976, 40, 869.

Глава XX. ЗАГАР И ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В КОЖЕ

По всей видимости, исторически загар был первой фотобиологической реакцией, которую заметил человек.

При УФ-облучении позвоночных практически все фотохимические реакции локализованы в покровных тканях и прежде всего в коже, поскольку УФ-радиация не проходит через кожные покровы и не достигает глубже лежащих тканей.

Прежде чем перейти к фотобиологическим реакциям в коже, коротко остановимся на ее строении на примере кожи человека.

Кожа человека состоит из эпидермиса и дермы (собственно кожа). Эпидермис — многослойный плоский эпителий, поверхностные

слой которого подвержены ороговению. Толщина эпидермиса 0,07—0,12 мм. В эпидермисе представлены пять слоев, расположенных в следующем порядке: базальный, шиповидный, зернистый, блестящий и самый поверхностный роговой слой, состоящий из омертвевших эпителиальных клеток. Базальный слой граничит с дермой и состоит из полиэдрических клеток. Непосредственно примыкающие к дерме клетки способны к делению и ответственны за рост эпидермиса. В этом же слое находятся особые пигментные клетки меланоциты, или меланобласты. Они содержат повышенное количество тирозиназы, участвующей в превращении тирозина в меланин. Шиповидный слой состоит из клеток кубической формы, в межклеточных пространствах циркулирует лимфа. Клетки зернистого слоя уплощены и содержат в цитоплазме особое вещество кератогиалина. В следующем слое — блестящем — уже заметны признаки ороговения клеток. Цитоплазма клеток этого слоя заполнена блестящими, расплывшимися зернами кератогиалина.

Дерма состоит из двух слоев: сосочкового и ретикулярного. Толщина ее не превышает 1—2 мм. Сосочковый слой сформирован рыхлой соединительной тканью, пронизанной коллагеновыми, эластическими, мышечными и нервными волокнами, а также сосудами, питающими эпидермис. Здесь находятся пигментные клетки (меланофоры), не содержащие тирозиназу. В ретикулярном слое кроме коллагеновых и эластических волокон содержится много клеток, типичных для соединительной ткани (фибробласты, гистиоциты, тучные клетки).

Благодаря толщине, высокому содержанию поглощающих УФ-свет веществ (белки, нуклеиновые кислоты), а также гетерогенности внутренней структуры кожа плохо проницаема для ультрафиолетовых лучей. Эффекты поглощения, отражения и рассеивания (рис. 63) приводят к быстрому ослаблению интенсивности луча УФ-света по мере прохождения его через кожу. Понятно поэтому, что более активным в фотохимическом отношении является эпидермис, а не дерма.

Облучение кожи ультрафиолетовым светом приводит к ряду физиологических эффектов: сжатию и расширению кровеносных сосудов, торможению роста, эритеме, эдеме, прямой и не прямой

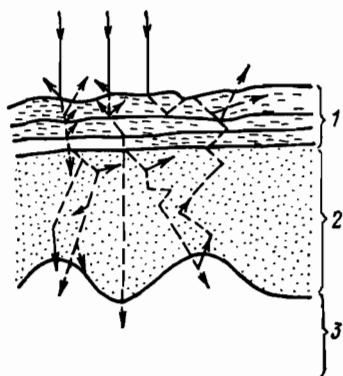


Рис. 63. Оптические эффекты в коже:

1 — роговой слой; 2 — эпидермис; 3 — дерма

пигментации (загару), стимуляции деления клеток и канцерогенезу. Рассмотрим наиболее важные фотобиологические реакции.

1. ЭРИТЕМА

Эритема (от греческого слова *erythema* — краснота) — сложный комплекс индуцированных ультрафиолетовым светом биохимических и морфологических изменений в коже, проявляющихся в стойкой ее *гипере-*

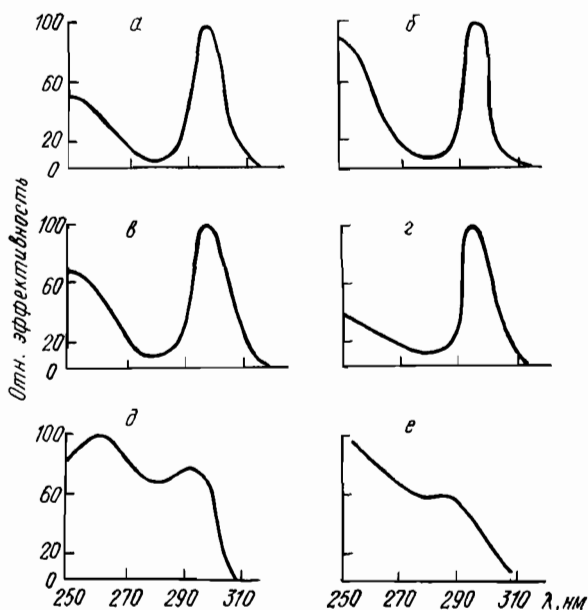


Рис. 64. Спектры действия эритемы, полученные Хаусером, 1928 (а), Лукишем и др., 1930 (б, в); Кобленцем и др., 1932 (г); Фримэном и др., 1966 (д) и Эвереттом и др., 1965 (е) (Johnson B. et al., 1968)

мии. Эритеме предшествует латентный период, продолжительность которого зависит от дозы облучения.

Большинство авторов, исследовавших спектры действия эритемы, обнаружили максимум при 297 нм,

глубокий провал при 280 нм и подъем в более коротковолновой области спектра (рис. 64, а — г).

Длинноволновая граница эритемного эффекта располагается при 310 нм. Однако в более поздних и методически совершенных работах (Эверетт и др., 1965; Фримэн и др., 1966) провал при 280 нм в спектре действия эритемы не обнаружен (см. рис. 64, д, е). Тем не менее различают два вида эритемы — *длинноволновую* (длина волны возбуждения 297 нм) и *коротковолновую* (длина волны возбуждения 254 нм). Температурный коэффициент (Q_{10}) латентного периода эритемы-297 достаточно высок (2,3), в то время как эритема-254 практически не зависит от температуры. Удаление рогового слоя увеличивает чувствительность кожи к свету с длиной волны 297 нм и уменьшает ее к свету с длиной волны 254 нм. Последнее обстоятельство указывает на то, что акцепторы биологически активного света располагаются в роговом слое кожи.

Для обеих эритем характерно явление фотореактивации. Если вслед за облучением кожи «эритемным» светом подвергнуть ее освещению с длиной волны 315—500 нм, можно наблюдать уменьшение эритемного эффекта. По-видимому, вследствие этого для монохроматического света правило Бунзена—Роско выполняется, а для полихроматического света — нет. В то же время явление фотопротекции не свойственно эритемным реакциям кожн.

Сущность фотохимических реакций, приводящих к эритеме, до сих пор не ясна. Природа эритемного хромофора в коже также не выяснена. Предполагается, что им может быть белок или нуклеиновые кислоты. Во всяком случае не вызывает сомнения, что как хромофоры, так и механизмы длинноволновой и коротковолновой эритемы различны. Эритема-254 имеет более короткий латентный период и исчезает быстрее, чем эритема-297. Их дозные кривые различаются. Не одинаковы и морфологическая картина этих эритем, а также активные фотопродукты, накапливающиеся в ткани.

Предполагается, что УФ-свет каким-то образом способствует образованию вазодилататора гистамина (по-видимому, из гистидина), который вызывает расширение капилляров и выход из них лейкоцитов в окружаю-

щие ткани. Действительно, при введении гистамина в кожу удается моделировать морфолого-физиологическую картину эритемы.

Справедливость этой гипотезы сколько-нибудь однозначно не доказана. В опытах одних авторов наблюдалось уменьшение эритемы при введении антигистаминных препаратов перед УФ-облучением, а в опытах других подобная протекция не обнаружена. Поскольку гистидин как потенциальный предшественник гистамина поглощает только свет с длиной волны менее 250 нм, реакция гистидин $\rightarrow$ гистамин должна носить сенситизированный характер.

Согласно другой точке зрения, причиной эритемы может быть фотохимическое декарбоксилирование 5-гидрокситриптофана с образованием 5-гидрокситриптамина (серотонина). Действительно, УФ-свет способен вызывать эту реакцию как *in vitro*, так и *in vivo* (в коже).

Д. И. Рошупкин с сотр. установили, что аппликация на кожу кроликов до или сразу же после облучения таких антиоксидантов, как α -токоферол и β -ионол, резко ослабляет эритемную эффективность УФ-света. Это позволяет думать, что перекисное фотоокисление липидов может быть одним из первичных явлений в возникновении эритемной реакции.

Большое количество работ посвящено изучению биохимических сдвигов в коже, вызванных ультрафиолетовым светом. Отмечается ингибирование синтеза аминокислот при неизменном содержании ДНК и РНК, увеличение количества продуктов окисления и прежде всего перекисей липидов на фоне разрушения линоленовой кислоты и фосфатидилэтаноламина, уменьшение фосфатазной активности в коже и возрастание β -глюкуронидазной активности в крови.

Очевидно, что темновые реакции, приводящие к эритеме, чрезвычайно сложны и включают как гуморальные, так и нервнорефлекторные механизмы не только в коже, но и во всем организме. На это указывают многочисленные опыты, в которых показано влияние на эритему генотипа и фенотипа организма, а также различных «нервных» факторов, таких как денервация кожи, местная и общая анестезия, включая

алкогольное опьянение, болевое и электрическое раздражение и т. д. Более того, на фоне некоторых соматических заболеваний развивается уртикария, т. е. крайне повышенная чувствительность кожи к УФ-облучению, проявляющаяся в быстро развивающейся эритеме, отеке, десквамации эпителия и сильном зуде.

2. ЭДЕМА

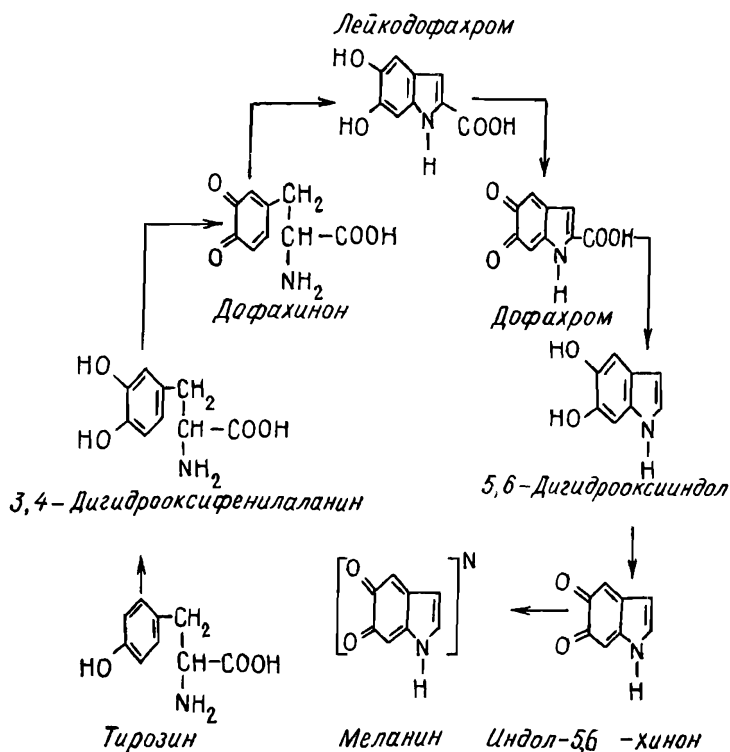
Эдема проявляется в покраснении и отеке кожи, обусловленном увеличением проницаемости капилляров и выпотом жидкости в окружающие ткани. Особенности этого эффекта изучены в основном на коже мышей. В общем эта фотобиологическая реакция близка к эритеме. Эдема — бифазная реакция. Различают непосредственную (прямую) и отсроченную (задержанную) эдему. Для возникновения непосредственной эдемы необходимы большие дозы ультрафиолетового света. Спектры действия как отсроченной, так и непосредственной эдемы напоминают спектры действия эритемы. Характерно, что с увеличением возраста животных эффективность коротковолнового ультрафиолетового света (260—280 нм) уменьшается. Известны данные, согласно которым фотохимические реакции, приводящие к эдеме, локализованы в эпидермисе кожи.

3. ПИГМЕНТАЦИЯ КОЖИ (ЗАГАР)

Принято различать непрямую пигментацию, развивающуюся из эритемы через несколько дней после облучения, и прямую (непосредственную) пигментацию, возникающую практически без латентного периода под влиянием света с длиной волны 320 нм. По своей природе эти две фотобиологические реакции существенно различаются.

Непрямая пигментация. Механизм возникновения загара до сих пор не выяснен. Тем не менее не вызывает сомнения то, что ультрафиолетовый свет каким-то образом способен запускать сложную цепь темновых реакций биосинтеза основного пигмента кожи — *меланина*.

Меланин представляет собой неупорядоченный, хаотический полимер, построенный из дигидрооксииндольных единиц, белка и металлов (металлопротеид). Предшественником мономерных единиц меланина служит аминокислота тирозин. Это следует из опытов, в которых использовался метод меченых атомов. Меченый по углероду тирозин вводился животным, которые затем облучались УФ-светом. В конечном счете эта метка обнаруживалась в выделяемом из кожи меланине. На основании радиоизотопных опытов установлена определенная последовательность превращения тирозина в меланин:



Процесс меланогенеза осуществляется в особых, отличных от митохондрий и рибосом внутриклеточных

органеллах *меланосомах*, которые содержатся в специализированных клетках кожи — *меланоцитах*. Меланосомы выделены из меланоцитов методом препаративного центрифугирования в градиенте плотности и обладают высокой тирозиназой (ДОФА-оксидазой) активностью. По мере протекания меланогенеза меланосомы постепенно превращаются в коричневые меланиновые гранулы, которые диссеминируют в мальпигиевом слое кожи, придавая ей характерную окраску (загар). Методом электронной микроскопии показано, что зрелые меланиновые гранулы ($d=300\div500$ Å) ассоциированы с мембранами клетки.

Биосинтетическая цепь образования меланина не включает, по-видимому, прямых фотохимических стадий. Свет, следовательно, *лишь активирует* аппарат биосинтеза пигмента. Действительно, при УФ-облучении увеличивается количество меланоцитов и содержащихся в них меланосом, резко усиливается синтез структурных мембранных белков, а также ферментов, участвующих в многостадийной реакции превращения тирозина в меланин. В связи с этим предполагается, что УФ-облучение изменяет активность генома через прямую или косвенную фотоинактивацию репрессоров, которые управляют биосинтезом ферментов, принимающих участие в реакциях меланогенеза. В то же время, как показано К. А. Самойловой с сотр., большие дозы коротковолнового ультрафиолетового света (254 нм) препятствуют появлению обычной для загара пигментации под действием естественной солнечной радиации. Эффект блокирования загара ультрафиолетовым «ударом» сохранялся на протяжении 1—1,5 месяца и связан, по-видимому, с повреждением аппарата меланогенеза.

Прямая (непосредственная) пигментация. По сравнению с непрямой прямая пигментация вносит неизмеримо меньший вклад в возникновение загара. Прямая пигментация заключается в незначительном потемнении кожи *сразу же после* (или во время) ее облучения. Это потемнение нестойко и сравнительно быстро исчезает в темноте. Для прямой пигментации необходимы дозы света $2\text{--}6 \cdot 10^4$ Дж/м², т. е. на два

порядка большие, чем для эритемы. Спектр действия прямой пигментации представляет собой широкую бесструктурную полосу, простирающуюся от 300 до 700 нм с максимумом в районе 400—480 нм (рис. 65).

Эта фотобиологическая реакция, по мнению Патака, обусловлена прямым фотоокислением локализованного в меланоцитах бесцветного предшественника ме-

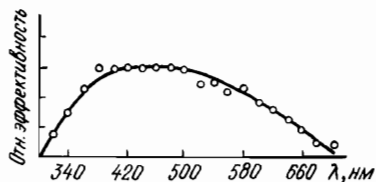
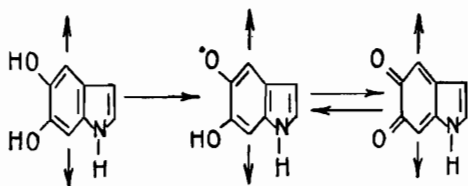


Рис. 65. Спектр действия прямой фотопигментации (Pat-hak M. et al., 1962)

ланина. Прямая пигментация протекает в несколько стадий через свободнорадикальные состояния. Об этом свидетельствуют фотоиндуцированные сигналы ЭПР, зарегистрированные при 77 К у пигментированной кожи, волос, меланосом, меланиновых гранул и ДОФА-меланина. Облучение меланина уменьшает время спинрешеточной релаксации в полимере. Предполагается, что поглощение кванта света мономерной единицей меланина приводит к ее окислению через образование семихинона согласно следующей схеме:



Таким образом, принципиальное отличие прямой пигментации от непрямой заключается в том, что в основе ее лежит *прямое фотохимическое превращение предшественника в меланин, а не косвенная активация ферментов цепи меланогенеза.*

В заключение остановимся на биологической роли меланина (загара), который выполняет функции оптического экрана, предохраняющего клетки от фотохимических повреждений. Судя по данным ЭПР, меланин

содержит большое количество как свободных радикалов, так и ловушек для них. Поэтому пигмент способен выступать в роли химического протектора, дезактиватора токсичных для организма свободнорадикальных состояний, которые генерируются как фотохимическим, так и, по-видимому, метаболическим путем.

4. КАНЦЕРОГЕНЕЗ

Хроническое УФ-облучение кожи может приводить к возникновению так называемых актиничных кератозов, которые способны к перерождению в злокачественные опухоли — саркомы и карциномы. Как правило, возникновению опухоли предшествует более или менее длительный латентный период. Установлено, что частота возникновения рака кожи у человека наиболее высока для открытых участков тела (голова, шея, руки). Кроме того, белые люди более подвержены заболеванию раком кожи, чем негры. Это, по-видимому, связано с защитной ролью меланина, которым обогащена кожа негров.

Тип опухоли определяется глубиной проникновения радиации в покровные ткани. Там, где она значительна, возникают соединительнотканые опухоли саркомы, там, где она невелика, — эпителиальные (рак кожи у «толстокожих» животных). По данным Блюма, монохроматический свет с длиной волны 254 нм вызывает преимущественно эпидермальные карциномы, а свет с длиной волны 280 нм — саркомы. Поскольку многократное УФ-облучение приводит к утолщению рогового слоя кожи, играющего роль инертного оптического экрана, доза каждого «сеанса» должна превышать пороговую эритемную дозу, иначе вероятность канцерогенеза значительно снизится. Повышение температуры стимулирует развитие канцерогенного процесса. Вероятность возникновения опухолей при облучении УФ-светом значительно повышается в присутствии канцерогенных веществ, например 7,12-диметилбензантрацена, 3,4-бензпирена. Существует обратная корреляция между естественной продолжительностью жизни животных данного вида и их фотоканцерогенной чувствительностью.

Спектры действия фотоканцерогенеза (впрочем, как и других фотобиологических процессов в коже) имеют несколько условный характер. Они отражают одновременно как спектральную чувствительность клеток, способных к злокачественному перерождению, так и спектры поглощения инертных покровных тканей. Неудивительно поэтому, что различные авторы, работающие с разными животными, приписывают максимальную канцерогенную активность несколько варьирующим спектральным участкам (от 260 до 300 нм), хотя длинноволновая граница спектров действия «единодушно» локализуется вблизи 320—340 нм. По мнению Блюма, акцепторами биологически активного света в тканях являются нуклеопротеиды.

Фотофизические и фотохимические стадии канцерогенеза не выяснены. Из рассматриваемых в литературе трех теорий фотоканцерогенеза — мутагенной, лизосомальной и фотохимической — наиболее экспериментально обоснована фотохимическая.

Фотоканцерогенез — процесс *кумулятивный*, возникающий при хроническом УФ-облучении. Иными словами, для возникновения опухоли, по всей видимости, важно длительное поддержание на определенном уровне критического количества стабильных канцерогенных фотопродуктов. До сих пор еще не описана индукция опухоли при однократном УФ-облучении, что, в принципе, должно было иметь место при мутационной природе опухолеобразования.

Детальное исследование влияния УФ-облучения на стабильность лизосомальных мембран показало, что УФ-индуцированный лизис лизосом является следствием УФ-повреждения иных (других, чем лизосомы) тканевых структур и поэтому вряд ли может быть основной причиной опухолевого роста.

Согласно фотохимической теории канцерогенеза, непосредственной причиной возникновения опухоли является образование в коже канцерогенного фотопродукта холестерин- α -оксида. Действительно, показано, что количество образовавшегося продукта пропорционально дозе облучения. При хроническом облучении концентрация этого канцерогена достигает наибольшего значения к 10-й неделе, т. е. к моменту возникнове-

ния опухоли. Различные антиоксиданты подавляют как образование опухолей, так и накопление холестерин- α -оксида.

Учитывая, что холестерин- α -оксид является продуктом перекисного окисления, трудно исключить участие в индукции опухолевого роста и других перекисных продуктов окисления липидов.

Рекомендуемая литература

Барабой В. А. Биологическое действие УФ-лучей.— Успехи соврем. биол., 1962, 53, 265.

Black H. S., Chen J. T. Experimental ultraviolet light-carcinogenesis.— Photochem. and Photobiol., 1977, 26, 183.

Blum H. Carcinogenesis by UV-light. Princeton, 1959.

Epstein J. H. Photomedicine.— In: The science of photobiology. N. Y., 1977, p. 175.

Johnson B., Daniels F., Magnus I. Response of human skin to ultraviolet light.— In: Photophysiology. N. Y., 1968, v. 3, p. 139.

Pathak M. Photobiology of melanogenesis: biophysical aspects.— Adv. Biol. Skin, 1967, 8, 397.

The biological effects of ultraviolet radiation (with emphasis on the skin). Oxford, 1969.

Глава XXI. СВЕТОВЫЕ БОЛЕЗНИ КЛЕТОК

В настоящей главе рассматриваются фотобиологические процессы, которые не приводят к гибели клеток, а сопровождаются лишь нарушением их физиологических функций. Данная группа реакций может быть отнесена к *патофизиологическим* реакциям. УФ-свет влияет практически на все метаболические и физиологические реакции растительных и животных клеток и микроорганизмов, причем рассмотрение колоссального фактического материала наталкивается на большие трудности. Это обусловлено преимущественно феноменологическим характером работ и отсутствием точных сведений о природе акцепторов света, фотофизике и фотохимии процессов.

Ограничимся перечислением некоторых фоточувствительных процессов; хотя в пределе это перечисление должно охватить все известные реакции и свойства живой материи: метаболизм белков и самых разнообраз-

разных ферментов, метаболизм всех видов нуклеиновых кислот, углеводный и липидный обмен, обмен витаминов, гормонов и кофакторов, водно-солевой обмен, дыхание, размножение, развитие организмов, их раздражимость, двигательная активность, нервно-мышечная деятельность, секреторные и выделительные функции и т. д.

В подавляющем большинстве случаев при УФ-облучении клеток угнетается метаболизм и физиологические процессы, хотя приводятся и отдельные примеры эффектов стимуляции. Например, ряд авторов отмечали стимуляцию деления и дыхания клеток микроорганизмов, животных и растений малыми дозами УФ-света. Как показали исследования К. А. Самойловой, митоз-стимулирующее действие УФ-света особенно отчетливо проявлялось у инфузорий, находящихся в угнетенном физиологическом состоянии. УФ-облучение может приводить даже к увеличению числа митохондрий в клетках (например, в листьях гороха). Описаны также случаи стимуляции продуктивности сельскохозяйственных растений и животных (последний эффект связан в значительной степени с фотобиосинтезом витамина D).

Эффективность патофизиологического действия УФ-света в сильной степени зависит от генотипа и фенотипа клетки или организма. При этом играет роль не только тип или вид клеток, но и их возраст и исходное физиологическое состояние. Большое значение имеют и факторы внешней среды: температура, концентрация кислорода, химический состав и рН среды, видимый свет и т. д. Влияние указанных факторов проявляется перед, во время и после УФ-облучения.

Спектры действия самых разнообразных патофизиологических процессов носят как белковый, так и нуклеиновый характер. Белковый максимум спектров действия (280 нм) характерен для следующих процессов: замедления дробления яиц морского ежа, оплодотворенных нормальной спермой; замедления образования цист у *Colpoda*; иммобилизации парамеций и их сенсibilизации к теплу; замедления развития яиц нематоды; стимуляции размножения *Chlorella vulgaris* и *Stichococcus bacillaris*. Нуклеиновые максимумы в

спектрах действия зарегистрированы при замедлении скорости регенерации *Blepharisma* и дроблении яиц морского ежа после оплодотворения облученной спермой; подавлении роста тканевой культуры; повышении чувствительности бактерий к трансформирующей ДНК; потере эвгленой хлоропластов.

В ряде случаев акцептором света, обладающего патологической активностью, является т-РНК. Так, спектр действия торможения роста *E. coli* В/г, характеризующийся максимумом при 340 нм, близок к спектру поглощения т-РНК, содержащей необычное основание — 4-тиоурацил. В опытах на изолированной т-РНК было обнаружено фотообразование сшивок между тиоурацилом (в положении 8) и цитидином (в положении 13), приводящее к уменьшению ее функциональной активности. Процессы инактивации т-РНК и торможения роста наблюдаются в одном и том же дозовом интервале.

Описаны также спектры действия физиологических реакций, указывающие на то, что в роли хромофоров могут выступать не только белки и нуклеиновые кислоты, но и липиды, витамины, коферменты, пигменты. Например, обратимое ингибирование синим светом митотической активности микроспороцитов *Lilium* и *Trillium* обусловлено фотохимическим повреждением цитохрома a_3 . Остановимся на некоторых патологических реакциях.

1. ИНГИБИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ДВИЖЕНИЯ И РАЗМНОЖЕНИЯ КЛЕТОК

Типичным примером ингибирования процессов движения и размножения может служить УФ-болезнь клеток, обнаруженная и изученная на парамециях Д. Н. Насоновым и В. Я. Александровым. Эти авторы показали, что облучение парамеций сублетальными дозами ультрафиолетового света приводит к волнообразным изменениям их функциональной активности (темпа деления, движение, питание) по схеме: снижение → подъем → снижение. Болезнь заканчивается либо гибелью особей на 19—23-й день, либо выздоровлением.

Эффект последствия, по данным К. А. Самойловой, характерен как для коротковолнового ($\lambda < 300$ нм), так и для длинноволнового ($\lambda > 300$ нм) УФ-света не только при летальных, но и малых нелетальных дозах.

Следует отметить также весьма наглядные опыты С. С. Чахотина, который ультрафиолетовым микропучком облучал различные структуры в клетках простейших. Характер изменения двигательной реакции зави-

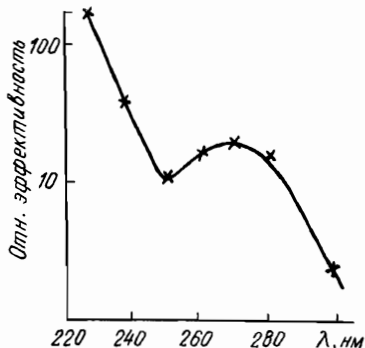
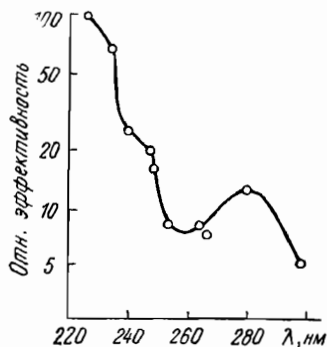


Рис. 66. Спектр действия иммобилизации *Paramecium caudatum* (Brandt С., Giese А., 1956)

Рис. 67. Спектр действия «побледнения» хромосом (Zirkle R., Uretz P., 1963)

сел не только от дозы, но и от того, какие группы ресничек на теле клетки подвергались облучению. Локальное облучение *Spirostomum*, *Stentor* и *Euglena* вызывало сильное сокращение всего тела. У *Climacostomum* это сокращение приводило даже к разрыву тела на две части. По данным Гизе, спектр действия потери подвижности парameций имеет белковый максимум при 280 нм (рис. 66). Сходный спектр действия характерен и для угнетения движения клеток в культуре ткани млекопитающих.

Ультрафиолетовый свет обладает также ярко выраженной способностью тормозить клеточные деления, повреждать митотический аппарат клетки и вызывать хромосомные аберрации. Облучение часто не сказывается на первом делении, но тормозит последующие. Это

замедление называется *стазом*. В зависимости от дозы стаз может длиться многие часы и даже дни.

В противоположность простейшим деление яиц морских беспозвоночных и клеток млекопитающих в культуре ингибируется обычно сразу же после облучения. Чувствительность к УФ-свету неодинакова на различных фазах митотического цикла. Так, нейробласты кузнечика обнаруживают наибольшую чувствительность в интерфазе и наименьшую — в профазе. Аналогичная зависимость обнаружена и у яиц морского ежа.

Продолжительность стаза контролируется также факторами внешней среды. Понижение температуры укорачивает и даже устраняет стаз. Таким же образом действует и видимый свет в пострадиационном периоде. Иными словами, повреждения, лежащие в основе стаза, фотореактивируются.

В опытах с использованием УФ-микроручков была предпринята попытка оценить соотносительную роль ядра и цитоплазмы в нарушениях клеточного деления. Оказалось, что УФ-облучение как ядра, так и цитоплазмы вызывает такие повреждения хромосом, при которых становится невозможным их деление. Если избирательно повредить светом кинетохор (место прикрепления нитей митотического веретена), хромосома утрачивает способность к направленному движению. УФ-облучение приводит также к слипанию хромосом. Молекулярный механизм замедления деления клеток может быть связан с повреждением белков митотического аппарата. Действительно, спектр действия торможения деления яиц нематоды имеет белковую природу (максимум при 280 нм). Цирклем с сотр. было показано, что спектр действия разрушения митотического веретена нейробластов эмбриона кузнечика близок к спектру поглощения тирозинсодержащего белка — 275 нм (рис. 67). Следствием деструкции веретена было замедление митозов в нейробластах. Как ни странно, это белковое по своей природе повреждение имело характер реакции первого порядка — одноударный механизм.

В последнее время появились данные в пользу тесной связи фотопатологии клеток с повреждением плазматических мембран. Так, в опытах К. А. Самойловой

с сотр. показано, что сразу же после УФ-облучения клетки начинают терять вещества белковой и углеводной природы. По мнению авторов, основным источником этих веществ являются мембрана и примембранные слои, которые разрушаются под влиянием УФ-света.

2. УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫЙ СВЕТ И ПРОНИЦАЕМОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Способность ультрафиолетового света вызывать нарушения проницаемости цитоплазматических мембран показана многими авторами. Обнаружено возрастание проницаемости мембран для различных катионов, воды и красителей у эритроцитов, дрожжей, яиц морского ежа, клеток валонии, элодеи, простейших и изолированных внутриклеточных органелл. Наряду с этим из облученных клеток выходят наружу нуклеотиды и фрагменты нуклеиновых кислот. Конечные макроскопические изменения (уменьшение внутриклеточных вакуолей, грануляция протоплазмы, увеличение жировых капелек, сжатие клетки) соответствуют по времени максимальному изменению проницаемости мембран. Чрезвычайно важно, что клетки с нарушенной проницаемостью в состоянии нормально размножаться, а их метаболизм в целом существенно не страдает.

Рассмотрим теперь более подробно некоторые примеры действия УФ-света на проницаемость мембран.

Удобными объектами для изучения влияния света на проницаемость внешней цитоплазматической мембраны клеток для воды являются простейшие. Обычно они живут и нормально функционируют в гипотоничной среде: концентрация солей внутри клетки выше, чем вне ее. Поэтому осмотические силы постоянно нагнетают воду в клетку. Для поддержания гомеостаза простейшие с помощью сократительных вакуолей выбрасывают излишки воды из клетки. Было обнаружено, что ультрафиолетовое облучение (около 1000 Дж/м²). *Amoeba proteus* и *Paramecium caudatum* делает их наружные мембраны более проницаемыми для воды. Это проявляется в увеличении объема контрактильных ва-

куолей и частоты их пульсаций. По мере увеличения облучения аппарат элиминации воды повреждается, вакуоли теряют способность к сокращению. В конце концов клетка набухает, а затем разрывается.

Ускорение проникновения воды в клетку наблюдается также у эритроцитов млекопитающих. Наряду с этим выравнивается концентрация ионов натрия и калия в системе эритроцит—окружающая среда. Как и у простейших, большие дозы ультрафиолетового света приводят к разрыву клеток — гемолизу эритроцитов. Температурный коэффициент гемолиза приблизительно равен двум, что указывает на участие в процессе темновых химических реакций. Скорость гемолиза зависит от pH. Минимальные значения ее отмечены при $\text{pH} = 5,8\text{—}7,8$.

Процесс фотонарушения ионной проницаемости у эритроцитов характеризуется квадратичной зависимостью от дозы. Иными словами, для возникновения эффекта необходимо повреждение не одной, а нескольких молекул в мембране.

О способности УФ-света вызывать серьезные нарушения проницаемости мембран для ионов K^+ и Na^+ свидетельствуют и опыты по облучению возбудимых клеток. Так, ультрафиолетовое облучение уменьшает амплитуду спайка и скорость проведения нервного импульса. С помощью микроэлектродной техники на одиночном аксоне лягушки было показано, что проницаемость мембран для ионов K^+ увеличивается (падение потенциала покоя) с ростом дозы УФ-облучения. Более того, с помощью УФ-облучения можно вызвать генерацию потенциала действия механорецепторов у рака и потенциал действия у водоросли *Nitella*, что указывает на резкое увеличение проницаемости мембраны для ионов Na^+ (известно, что потенциал действия имеет в основном «натриевую» природу).

Спектры действия изменения клеточной проницаемости в зависимости от типа биологических мембран имеют различную форму. Так, спектры действия увеличения реобазы и блокирования натриевых каналов нервных волокон имеют отчетливый максимум около 280 нм. В то же время спектры действия инактивации калиевых каналов нервных волокон, гемолиза, накоп-

ления в дрожжевых клетках ионов Na^+ и выхода из них ионов K^+ не обнаруживают ни белкового, ни нуклеинового максимума и характеризуются вначале медленным, а затем резким повышением эффективности света по мере укорочения его длины волны (рис. 68).

Двойственный характер спектров действия наводит на мысль, что в мембране акцептором биологически

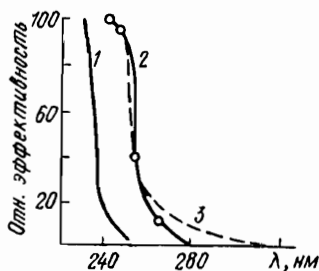


Рис. 68. Спектры действия различных мембранных процессов (Sanders R., Giese A., 1959; Hollaender A., 1938; Cook J., 1956):

1 — активация яиц *Arbacla punctuata*; 2 — аккумуляция Na^+ дрожжами; 3 — гемолиз эритроцитов

активного света являются хромофорные группировки белков и липидов. Как известно, в белках в области 280 нм наибольший вклад в поглощение света вносят остатки ароматической аминокислоты триптофана; в области спектра короче 250 нм фотохимически активный свет поглощается цистином и в области 220 нм — сульфгидрильными группами, пептидными связями, имидазольным гистидина. Основным хромофором в липидном компоненте являются ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав фосфоли-

пидов (область поглощения короче 225 нм), холестерин (250—300 нм) и α -токоферол (максимум спектра поглощения 292 нм). Все это позволяет полагать, что первичные фотохимические реакции в биологических мембранах могут быть сведены к первичным фотохимическим реакциям белков и липидов (см. гл. XIII, XIV).

Рассмотрим сначала участие липидной фотохимии в УФ-повреждении биологических мембран. Хорошо известно, что в мембранах при УФ-облучении имеет место накопление перекисных соединений и стабильных продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Первые данные такого рода получены в 1955 г. Оттоленги, Бернхаймом и Уилбуром на митохондриях. Позднее Эречинска обнаружила корреляцию между концентрацией продуктов окисления липидов в мембране

и степенью набухания митохондрий, свидетельствующую о нарушении барьеров проницаемости. Аналогичные данные получены и в модельных опытах: продукты фотоокисления ненасыщенных жирных кислот, их эфиров и фосфолипидов *in vitro* способны нарушать проницаемость мембран. В опытах с искусственными бимолекулярными фосфолипидными мембранами показано, что УФ-свет вызывает резкое необратимое падение их электрического сопротивления — возрастание проницаемости для протонов, ионов Na^+ и K^+ , причем в атмосфере аргона эффект был выражен в значительно меньшей степени.

В последние годы в работах Ю. А. Владимирова и Д. И. Рошупкина приведены дополнительные доказательства, указывающие на важную роль свободнорадикального перекисного фотоокисления ненасыщенных жирных кислот в УФ-индуцированной модификации ионной проницаемости биологических мембран. По их данным, глубина УФ-индуцированных мембранных эффектов сильно зависит от концентрации кислорода и антиоксидантов в среде. Так, в бескислородной среде заметно снижается УФ-чувствительность эритроцитарных и митохондриальных мембран, тестируемая по увеличению катионной проницаемости и разобщению окислительного фосфорилирования соответственно. Ингибитор перекисного окисления α -токоферол замедляет УФ-индуцированный гемолиз. Такие факторы внешней среды, как температура и pH, контролирующие процессы перекисного окисления липидов, по-видимому, за счет прежде всего структурной реорганизации белкового матрикса, модифицируют эффективность гемолитического действия УФ-света. При этом отмечается корреляция между изменениями биологической эффективности УФ-света и накоплением продуктов перекисного окисления.

По мнению Ю. А. Владимирова с сотр., перекисное окисление липидов оказывает повреждающее действие на биологические мембраны не только через изменение свойств липидных зон, но и опосредованно — через деструкцию сульфгидрильных групп мембранных белков. Вывод о преобладающей роли альдегидов и кетон в повреждении мембран был сделан на основании

опытов, в которых облучение проводилось светом различных длин волн, что меняло соотношение между накопленными в мембранах гидроперекисями и конечными продуктами.

По всей видимости, важную роль в нарушении ионной проницаемости биологических мембран играют и белковые УФ-повреждения. Кроме «белковых» спектров действия на это указывают и следующие факты.

1. Фотоокисление липидов в мембранах идет с заметно меньшей эффективностью, чем в растворе. Для обнаружения продуктов окисления нужно использовать высокочувствительные методы анализа.

2. Эвакуация кислорода, полностью предотвращающая фотоокисление липидов *in vitro*, лишь частично устраняет действие света на проницаемость клеток.

3. В составе липидов многих бактериальных мембран представлены обычно лишь насыщенные и мононенасыщенные жирные кислоты, которые практически не вовлекаются в процессы перекисного окисления.

Следует иметь также в виду, что в интактных мембранах способностью окисляться обладают не все липиды, а лишь некоторая часть липидного пула, и уровень фотоокисляемости липидов контролируется стерическим фактором — пространственным взаиморасположением мембранных компонент, т. е. структурной лабильностью мембраны. Известно, что вещества, стабилизирующие мембрану, уменьшают, а вещества, лабилизирующие ее, наоборот, увеличивают фоточувствительность клеточных мембран.

В заключение коротко остановимся на соотносительной чувствительности систем активного и пассивного транспорта в мембранах к УФ-свету.

По-видимому, фотохимическое повреждение в мембране клетки оказывает основное влияние не на *активный*, а на *пассивный* транспорт веществ. Так, ингибирование синтеза макроэргов, необходимых для активного транспорта, не влияет на УФ-чувствительность проницаемости мембран дрожжевых клеток для катионов калия и натрия. С другой стороны, Кук, количественно оценив соотношения между скоростями ионных потоков Na^+ , K^+ и Cl^- , набуханием эритроцита и дозой УФ-облучения, на основании коллоидно-осмотической теории

связал процесс нарушения проницаемости (гемолиз) с простой диффузией (пассивный транспорт). При этом скорость гемолиза оказалась прямо пропорциональной коэффициентам проницаемости эритроцитарных мембран для ионов K^+ и Na^+ . Можно предположить, что диффузия усиливается под действием УФ-света вследствие конформационных перестроек мембраны с изменением микро мозаики зарядов в ней. В пользу этого свидетельствует как образование ковалентных сшивок в облученных мембранах, так и уменьшение скорости растворения таких мембран в детергентах.

Рекомендуемая литература

Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.

Потапенко А. Я., Рошупкин Д. И., Когон Е. А., Владимиров Ю. А. Исследование действия УФ-света на биологические мембраны. Измерение электропроводности бимолекулярных фосфолипидных мембран.— Докл. АН СССР, 1972, 202, 882.

Рошупкин Д. И., Пеленицын А. Б., Талицкий В. В. Действие ультрафиолетового излучения на мембранные структуры животных клеток.— В сб.: Роль изменений структуры мембран в клеточной патологии. М., 1977, с. 53.

Самойлова К. А. Действие УФ-радиации на клетку. Л., 1967.

Cook J. Some characteristics of hemolysis by UV-light.— J. Cell. Comp. Physiol., 1965, 47, 55.

Cook J. The quantitative interrelationship between ion fluxes, cell swelling and radiation dose in UV-hemolysis.— J. Gen. Physiol., 1965, 48, 719.

Ottolenghi A., Bernheim F., Wilbur K. The inhibition of certain mitochondrial enzymes by fatty acids oxidized by UV-light or ascorbic acid.— Arch. Biochem. Biophys., 1955, 56, 157.

Pathology of cell membranes. N. Y., 1975.

Sanders R., Giese A. The effect of UV-light on the sodium and potassium composition of resting yeast cells.— J. Cell Physiol., 1959, 42, 589.

Глава XXII. ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Фотодинамическое действие — это необратимое повреждение светом биологических структур (или функций) в присутствии кислорода, сенсibilизированное введенными в клетки или организмы хромофорами (на-

пример, красителями). Комбинация краситель+свет+кислород является, как правило, необходимым признаком этой реакции. Сочетания краситель+свет и свет+кислород чаще всего неэффективны, хотя в литературе и описаны отдельные примеры сенсibilизированных красителем фотобиологических реакций в анаэробных условиях: летальное действие фурукумаринов на бактерии, инактивация ДНК вирусов, инактивация ферментов *in vivo* и *in vitro*.

Фотодинамически активные красители можно подразделить на три класса: 1) обладающие большим сродством к кислороду и малым сродством к восстановителям (ксантины, акридины, тиазины, некоторые порфирины, рибофлавин); 2) являющиеся хорошими акцепторами водорода в возбужденном состоянии (антрахиноны, производные индантрена — флавантрен, пирантрен); 3) сходные по структуре с веществами предыдущей группы, но обладающие умеренным сродством к кислороду.

Общей особенностью всех фотодинамических красителей является их способность к флуоресценции, т. е. к удержанию поглощенной энергии в течение достаточно длительного времени (не менее 10^{-9} с).

Фотосенсibilизирующей активностью обладает также ряд фармакологических (анестетики, антибиотики, барбитураты и др.) и канцерогенных веществ.

Квантовый выход фотодинамического действия может колебаться в широких пределах, превышая в отдельных случаях единицу. Причиной подобного явления могут быть фотохимические цепные реакции или темновые процессы с участием первичного фотопродукта. Например, Г. П. Гуриновичем с сотр. показано, что высокий квантовый выход (около 2) сенсibilизированного пигментами фотоокисления тиомочевина (реакция Варбурга), оцениваемый по расходу кислорода, связан с двухэтапностью процесса. Оказалось, что кислород потребляется не только в ходе самой фотохимической реакции, но и на последующей темновой стадии. В результате на окисление одной молекулы тиомочевина расходуется две молекулы кислорода.

К фотодинамическому действию чувствительны практически все биологические объекты: биологические

молекулы различных размеров, биополимеры, внутриклеточные органеллы, клетки, ткани, вирусы растений, фаги, микроорганизмы, высшие и низшие растения, беспозвоночные и позвоночные животные.

Следует подчеркнуть, что при фотодинамическом действии на организмы и клетки могут повреждаться любые функции и структуры, свойственные живой материи. Так, наблюдаются летальные (бактерицидное действие, инактивация фагов и т. д.), лизогенные, мутагенные, канцерогенные эффекты, нарушение и стимуляция деления клеток, хромосомные aberrации, подавление фотосинтеза, реакции Хилла, синтеза ДНК, РНК и белка, угнетение гликолиза, дыхания, окислительного фосфорилирования, деструкция ферментов и нуклеиновых кислот, нарушение проницаемости мембран, подавление двигательной активности, эритема, некрозы и эдема кожи, сенсорная стимуляция, изменение температуры и артериального давления крови, аллергия, циркулярный коллапс и т. п.

Понятно, что для каждого отдельного сенсibilизатора и биологического объекта первично повреждаются не все, а одна или несколько определенных, наиболее чувствительных жизненно важных структур (функций). Следствием первичного повреждения «слабого места» являются нарушение других структур (функций) и в пределе гибель клетки или организма. Какие молекулярные структуры клетки повреждаются в первую очередь, определяется, с одной стороны, природой красителя, с другой — особенностями биологического объекта: проницаемостью клеток для хромофора и его микрораспределением внутри клетки (комплексирование с макромолекулами). Иными словами, в каждом конкретном случае (определенный краситель и определенный биологический объект) могут первично повреждаться самые различные молекулярные структуры: структурные белки мембран, различные ферменты, фосфолипиды, РНК, ДНК.

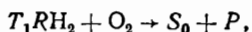
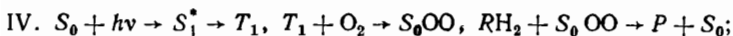
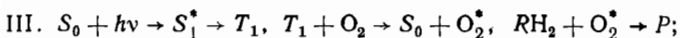
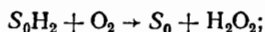
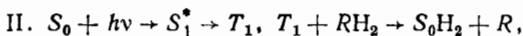
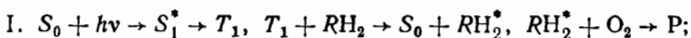
Природа акцептора фотодинамически активного света очевидна. Это *проникший в клетку хромофор* (краситель). Поэтому спектры действия фотодинамического повреждения должны совпадать со спектрами поглощения красителя, что и наблюдается в эксперименте.

Во многих случаях фотодинамическое повреждение биологических объектов протекает по одноквантовому одноударному механизму. Однако у некоторых микроорганизмов сенсibilизация летального и мутагенного действия света имеет различные механизмы. Например, у нейроспоры фотодинамический бактерицидный эффект — одноударный, а мутагенный — двухударный процесс. Наконец, если кванты света через фотодинамический эффект адресуются ферментам, содержание которых в клетке велико (например, данный фермент представлен 1000 молекулами), то фотодинамическое действие будет протекать по многоударному механизму, поскольку инактивация одной или нескольких молекул не приведет к гибели клетки. Наоборот, гибель клеток или фагов в результате фотодинамического повреждения ДНК является, как правило, одноударным процессом.

Из сказанного ясно, что цепь событий, ведущих к биологическому эффекту, начинается с образования синглетного возбужденного состояния красителя. Однако непосредственно участвуют в первичных фотохимических реакциях не синглетные, а *триплетные* возбужденные молекулы. Участие триплетного состояния красителя в фотосенсибилизированном окислении доказывается следующими опытами: 1) по дезактивации триплетных и синглетных состояний различными тушителями, в которых показан параллелизм между тушением фосфоресценции и уменьшением квантового выхода фотоокисления ряда органических веществ; 2) в которых выявлена способность акцепторов, уменьшающих заселенность триплетных уровней красителя за счет триплет-триплетной миграции, снижать концентрацию радикалов, участвующих в реакции окисления; 3) по идентификации триплетных состояний методом флеш-фотолиза при сенсибилизированном окислении яичного альбумина, аминокислот и других органических молекул, а также нуклеиновых кислот; 4) где показана способность возбужденной свободно диффундирующей молекулы красителя инактивировать белок при столкновении с ним спустя время, за которое синглетное состояние полностью дезактивируется. Действительно, рост квантового выхода сенсибилизированной инакти-

вации пепсина и миозина прекращается после достижения концентрации белка 10^{-4} М, при которой среднее время между столкновениями молекул белка и красителя намного больше (около 10^{-5} с), чем время жизни синглетного состояния (10^{-9} с).

Участие триплетных состояний красителей предусматривается во всех предложенных схемах фотодинамического действия:



где S_0 — краситель; P — продукт; S_1^* и T_1 — первые синглетные и триплетные возбужденные состояния соответственно; RH_2 — субстрат; RH_2^* — возбужденный субстрат; R — окисленная форма субстрата; O_2^* — возбужденная реактивная форма кислорода, скорее всего синглетная; S_0H_2 — фотовосстановленная форма красителя; S_0OO — реактивный комплекс красителя с кислородом; S_0RH_2 — комплекс краситель — субстрат; $S_1^*RH_2$ и T_1RO_2 — синглетное и триплетное состояния комплекса краситель — субстрат.

Как видно из схем, краситель выступает в роли триплетного фотокатализатора и регенерируется в конце реакции. Для всех пяти схем обязательным является участие кислорода *), который реагирует либо с возбужденным за счет миграции энергии субстратом (V), либо с восстановленным (II), или «триплетным» (IV) красителем. Наконец, может иметь место реакция между возбужденным кислородом и субстратом (III).

Окислительные повреждения субстрата в реакциях фотодинамического действия осуществляются высокореак-

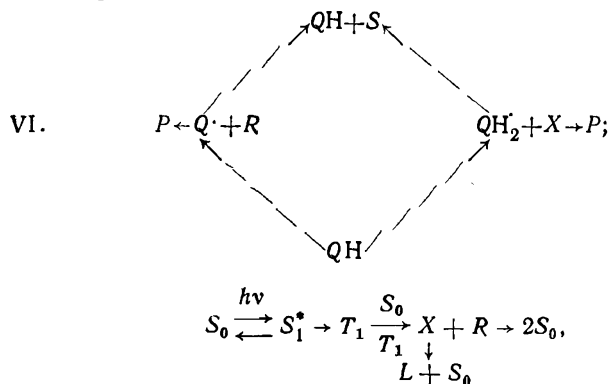
*) Обычное состояние кислорода триплетное. Синглетный кислород обладает повышенной реакционной способностью.

ционным синглетным кислородом, или супероксидным радикалом $\cdot\text{O}_2^-$. Синглетный кислород способен существовать в двух возбужденных состояниях, одно из которых обладает продолжительным временем жизни и возникает при переносе энергии с триплетного возбужденного состояния на кислород: $^3\text{S} + ^3\text{O}_2 \rightarrow \text{S}_0 + ^1\text{O}_2$. Затем уже синглетный кислород окисляет субстрат: $\text{P} + ^1\text{O}_2 \rightarrow \text{P}_{\text{окисл}}$. Признаками участия синглетного кислорода являются усиление фотоокисления веществ после замены H_2O ($\tau_{^1\text{O}_2} = 20$ мкс) на D_2O ($\tau_{^1\text{O}_2} = 2$ мкс) и замедление реакции после добавления азиды натрия.

Супероксидный радикал кислорода возникает в реакциях анионрадикала красителя и его триплетного состояния с кислородом: $\cdot\text{S}^- + \text{O}_2 \rightarrow \text{S}_0 + \cdot\text{O}_2^-$ или $^3\text{S} + ^3\text{O}_2 \rightarrow \cdot\text{S}^+ + \cdot\text{O}_2^-$. Он обладает способностью эффективно окислять субстрат: $\text{P} + \cdot\text{O}_2^- \rightarrow \text{P}_{\text{окисл}}$.

Следует отметить, что β -каротин, являющийся дезактиватором триплетных состояний и синглетного кислорода, резко тормозит фотодинамическое действие света.

Приведенные схемы могут быть дополнены еще одной, описывающей фотосенсибилизированные реакции в анаэробных условиях:

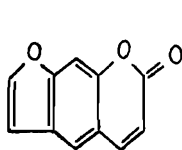


где X — семиокисленный эозин; R — семихинон эозина; L — лейкооснование эозина; QH — субстрат; QH_2 и Q — восстановленная и окисленная формы субстрата соответственно. И в этом случае фотодинамическое действие реализуется через триплетное состояние красителя.

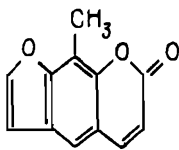
Приведенные схемы предусматривают также, что первичная фотохимическая реакция при фотодинамическом действии сводится к *окислительно-восстановительным превращениям*. Можно думать, что в большинстве случаев реакции идут через свободнорадикальные промежуточные состояния субстратов, как это установлено, например, для фенола, тирозина и триптофана.

В качестве партнеров по окислительно-восстановительным превращениям в парах краситель — субстрат (схемы I—V) могут выступать самые разнообразные биологически важные вещества. При этом наиболее эффективно будут разрушаться те вещества, с которыми краситель из-за повышенного сродства либо образует комплекс, либо находится в непосредственной близости. В многочисленных опытах *in vitro* удалось показать, что фотодинамическим путем окисляются практически все биологически важные вещества: органические кислоты, спирты, альдегиды, кетоны, амины, эфиры, фенолы, пироллы, индолы, азотистые гетероциклические соединения, стероиды, аминокислоты (цистеин, триптофан, тирозин и др.), пурины, нукленовые кислоты и белки.

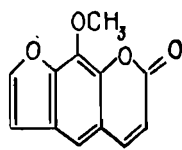
В заключение коротко остановимся на фотосенсибилизированных фурукумаринами реакциях, протекающих без участия кислорода. К фурукумаринам относятся вещества из группы псоралена. Наибольшей фотобиологической активностью обладают псорален, 8-метилпсорален, 8-метоксипсорален:



Псорален



8-Метилпсорален

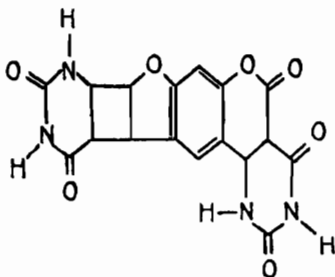


8-Метоксипсорален

оказывающие фотосенсибилизирующий эффект при введении в самые различные биологические системы. Например, в их присутствии облучение ближним УФ-светом ($\lambda > 310$ нм) вызывает эритему кожи, инактивацию вирусов, бактериальных и животных клеток. Установлено, что эти эффекты не фотореактивируются.

Как показали исследования Мусайо и Г. Б. Завиль-

гельского, при взаимодействии фурукумаринов с ДНК образуются структуры циклобутанового типа: моноаддукты и диаддукты. При этом в стабильный комплекс с участием реактивных 4—5 и 3—4 C=C-связей фурукумаринов вступают исключительно пиримидиновые основания ДНК и в первую очередь тимин:



Из работ Г. Б. Завильгельского также следует, что биологически эффективны не моноаддукты, а диаддукты 8-метоксипсоралена, сшивающие нити ДНК между собой. Вероятность инактивации ДНК при возникновении подобных сшивок очень велика. У двойных мутантов штамма *E. coli* K-12 *uvr*⁻, *hcs* A⁻ примерно одна сшивка соответствует одному летальному удару.

2. ЛИПИДЫ

Свет, поглощаемый красителями (протопорфирином IX и др.), вызывает сенсibilизированное окисление жирных кислот, причем эффективность их фотоокисления возрастает по мере увеличения ненасыщенности жирных кислот. В ряде работ показана роль синглетного кислорода в этом процессе. Как в модельных липидных системах, так и в биологических мембранах возможно фотодинамическое перекисное окисление липидов, протекающее по типу цепной реакции с образованием свободных радикалов. Сенсibilизированное перекисное окисление липидов зарегистрировано в наружных сегментах палочек сетчатки (сенсibilизатор — родопсин) и в мембранах эритроцитов (сенсibilизатор — протопорфирин).

3. БЕЛКИ

К настоящему времени опубликовано огромное количество работ, в которых исследовано фотодинамическое действие различных сенсibilизаторов на аминокислоты, пептиды и белки. В этом плане изучено уже более 100 очищенных белков. Основные результаты можно обобщить следующим образом.

Фотодинамически активные красители повреждают белок либо в адсорбированном на макромолекуле состоянии, либо в момент столкновения возбужденной молекулы красителя с белком. Белки повреждаются различными красителями по одноквантовому, одноударному механизму, что следует из экспоненциального характера дозной зависимости фотосенсибилизированной инактивации и взаимозаменяемости интенсивности и времени облучения. Квантовый выход фотоинактивации, как правило, низок (например, $6 \cdot 10^{-3}$ для системы лизоцим + рибофлавин и $5 \cdot 10^{-4}$ для системы пепсин + эозин или метиленовый синий) и обнаруживает выраженную зависимость от парциального давления кислорода, pH среды и концентрации красителя. Как показано Л. Х. Эйдусом с сотр., при увеличении концентрации белка квантовый выход возрастает до какого-то предела (кривая с насыщением). На первый взгляд это трудно объяснить. Обратим, однако, внимание на то важное обстоятельство, что квантовый выход фотодинамического действия рассчитывается с учетом всех поглощенных молекулами красителя квантов и при этом часть возбужденных молекул красителя дезактивируется раньше, чем произойдет их активное столкновение с белком. Отсюда понятно, что при увеличении концентрации белка возрастает частота столкновений и все большее число молекул красителя может реализовать свое действие (в момент насыщения практически все).

Эффективность фотодинамического действия резко уменьшается при дефиците воды, например, в пленках белка, что может быть связано с ухудшением диффузии или прямым участием воды в механизмах фотодинамического действия.

Квантовый выход фотосенсибилизированной инактивации понижается в присутствии многих веществ: аминокислот, сахаров, солей, витаминов и др.

кислот, восстановителей, других белков, ионов некоторых металлов, йодидов. В некоторых случаях описана защита белка одним фотодинамически активным красителем от действия другого (явление антагонизма).

Квантовый выход фотодинамического действия слабо зависит от температуры (энергия активации 3—5 ккал/моль), что свидетельствует об определяющей роли фотохимической реакции в суммарном процессе, не отягченном температурно-активируемыми темновыми химическими стадиями.

Фотодинамическое действие реализуется не через разрывы пептидных связей, а прежде всего через окисление остатков таких аминокислот, как гистидин, триптофан, тирозин, метионин, цистеин, причем наиболее легко окисляется гистидин и триптофан. Варьируя красители и характеристики среды, можно достичь более или менее избирательной деструкции определенных аминокислот. Например, гистидин разрушается при $\text{pH} \sim 6$ (азот имидазола ионизирован), тирозин — при $\text{pH} > 10$ (ионизирована гидроксильная группа фенольного кольца). Как правило, экспонированные на поверхности белковой глобулы аминокислоты разрушаются более эффективно, чем расположенные в ее сердцевине. При измерении методом флеш-фотолиза переходных спектров поглощения тирозина и триптофана Гросвейнером было показано, что, как и УФ-облучение, видимый свет в присутствии эозина (фотодинамический эффект) приводит к образованию одних и тех же лабильных промежуточных продуктов — аланин-феноксильных и 3-индольных свободных радикалов соответственно. Конечными стабильными продуктами фотоокисления триптофана являются кинуренины и меланины, цистина — цистеиновая кислота; гистидин и тирозин дают большой набор продуктов.

Обычно вслед за образованием стабильных фотохимических продуктов происходят конформационные перестройки белковой макромолекулы, на что указывают изменения ряда конформационно-чувствительных параметров: дисперсии оптического вращения, электрофоретической подвижности, вязкости, седиментационных характеристик, растворимости, ион- и коэнзимсвязывающих свойств, количества титруемых SH-групп, чувствительности к температуре и протеолитическим ферментам.

Результатом структурных перестроек являются изменения функциональной активности белков (каталитическая, иммунологическая, гормональная активность). Потеря функциональных свойств белков может быть вызвана и прямым разрушением аминокислотных остатков, входящих в активный центр фермента.

4. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Фотосенсибилизированной инактивации нуклеиновых кислот свойственны такие же физические закономерности, как и инактивации белков. Из пуриновых и пиримидиновых оснований наиболее чувствителен к сенсибилизирующему действию красителей гуанин. В опытах с гуанозином показано, что при его фотосенсибилизированном разрушении происходит разрыв обоих колец основания с образованием рибозы, мочевины, рибозил-мочевины и гуанидина. В фотоокислении гуанозина принимают участие как синглетный кислород, так и свободнорадикальные продукты. Флавины вызывают быстрое фотоокисление аденина и его нуклеотидов.

При изучении фотодинамического действия на системах ДНК (или РНК) + краситель обнаружена специфическая деструкция гуаниновых остатков при сравнительно меньшем повреждении тиминовых.

Имеются данные, что при фотосенсибилизированной инактивации разрывов рибозо-фосфатного остова нуклеиновых кислот не происходит. Как и в случае белков, реакция фотоокисления нуклеиновых кислот приводит к глубоким структурным перестройкам, о чем свидетельствуют изменения вязкости, температуры плавления ДНК, полярографического поведения, иммунологических свойств, чувствительности к гидролитическим ферментам. При фотодинамическом действии образуются также поперечные сшивки между ДНК и белком, что уменьшает экстрагируемость нуклеиновой кислоты из клетки.

Структурно-химические повреждения нуклеиновых кислот ведут к значительным нарушениям их биологической активности. Так, ДНК вируса табачной мозаики теряет инфекционную, а ДНК пневмококка — трансформирующую активность. Синтетическая полиуридил-гуа-

ниловая кислота утрачивает матричную активность при синтезе полипептидов в опытах *in vitro*, а транспортная РНК кишечной палочки — способность связывать аминокислоты. При облучении ДНК, полиаденилгуаниловой и полицитидиловой кислот в присутствии фотодинамических красителей снижается их матричная активность.

5. ВИРУСЫ И КЛЕТКИ

Рассматривая фотодинамическое действие различных красителей на вирусы и клетки, необходимо прежде всего акцентировать внимание на том, по какому пути — «нуклеиновому» или «белковому» — осуществляются повреждения. Удобными объектами для этого являются вирусы, состоящие, по существу, только из двух компонентов — нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) и белка. Фотосенсибилизированная инактивация вирусов протекает по одноударному механизму, что говорит о преимущественной роли нуклеиновых кислот. Наиболее эффективными оказались красители, которые обладают высоким сродством к нуклеиновым кислотам и активно комплексируют с ними в растворе.

С другой стороны, фотодинамическая активность красителей зависит от степени их проникновения через белковый чехол к нуклеиновой кислоте фага. Действительно, по данным Ямомото, изучавшего фотодинамическое действие многих красителей на бактериофагах Т-серии, наибольшей резистентностью обладали фаги (Т3, Т5, Т7), у которых проникновение красителей через белковый чехол было затруднено. Предынкубация фага Т2 с красителем при различных температурах сенсибилизировала его к действию света, причем величина температурного коэффициента была такой же, как и для процессов диффузии через мембрану ($Q_{10}=4$). К тому же эффекту приводила обработка фагов мочевиной, разрыхляющей белковую оболочку и облегчающей проникновение красителя к ДНК. Приведенные факты не оставляют сомнений в том, что первичное повреждение вирусов преимущественно локализовано в нуклеиновой кислоте. Это тем более справедливо для мутаций вирусов, обусловленных фотодинамическим действием. При фотодинамическом по-

вреждении бактериофагов наблюдаются разрывы полинуклеотидной цепи. Фотосенсибилизированные повреждения ДНК фагов могут элиминироваться системой темновой репарации, но не фотореактивации.

Менее ясен вопрос о путях реализации фотодинамического действия на уровне более сложноорганизованной системы — клетки, где, по-видимому, могут повреждаться как белки, так и нуклеиновые кислоты.

Для бактерий описаны как одно-, так и многоударные кривые летального действия. Мишени для фотодинамического удара в значительной мере определяются избирательностью накопления и сорбции красителей в различных структурах клетки. Например, акридиновые красители преимущественно концентрируются на хромосомах и вызывают их разрывы. Порфирины эффективно накапливаются в лизосомах и также повреждают их. Существенный вклад в фотосенсибилизированное повреждение клеток вносят и биологические мембраны. Еще в 1908 г. Спайксом был описан сенсibilизированный гематопорфирином или хлорофиллом гемолиз эритроцитов. К настоящему времени фотодинамическое повреждение мембран, проявляющееся в нарушении их структуры и функции (проницаемость, активность ферментов), продемонстрировано в большом числе опытов. В частности, показана фотодинамическая деполяризация нервных и мышечных волокон, нарушение барьеров проницаемости мембран лизосом с их разрывом и выходом гидролитических ферментов, выход ионов K^+ через плазматические мембраны клеток, разобщение дыхания и фосфорилирования в изолированных митохондриях.

По-видимому, по крайней мере некоторая часть мембранных эффектов связана с сенсibilизированным окислением липидов.

6. МНОГОКЛЕТОЧНЫЕ ОРГАНИЗМЫ

В данном параграфе рассматриваются некоторые проявления фотодинамического действия у многоклеточных животных и растительных организмов. Описано летальное действие света на личинки mosкитов и даже некоторые виды взрослых насекомых.

Остановимся лишь на отдельных фотосенсибилизированных реакциях, возникающих естественным путем, без специального «прокрашивания» тканей за счет эндогенных пигментов. Таким образом летально повреждается светом морская анелида *Tubifex*, простейшие *Blepharisma* (пигмент — зоопурпурин), некоторые растения и водоросли (пигмент — хлорофилл).

Гиперчувствительность к видимому свету, обусловленная повышенным содержанием порфиринов вследствие нарушения их метаболизма, характерна для млекопитающих животных и человека. Она может быть вызвана накоплением в коже и открытых для солнца местах тела животных фотодинамических веществ растительного происхождения, например гиперина, который содержится в некоторых растениях (зверобой). Питающиеся такой травой овцы на ярком солнечном свете заболевают и даже гибнут. Нарушение функции печени приводит к накоплению в коже фотодинамически активного производного хлорофилла — филоэритрина. Наконец, гиперчувствительность человека к свету может быть вызвана некоторыми лекарственными препаратами. Заболевания, вызванные фотодинамическим эффектом, обусловлены в основном вторичными явлениями, связанными с токсическим действием диффундирующих в кровь фотохимических продуктов.

Резюмируя сказанное, можно представить себе следующую наиболее вероятную схему фотодинамического действия: свет → сенсибилизатор → триплетное состояние сенсибилизатора → окислительные превращения с участием биологического субстрата (чаще всего с участием O_2) → фотопродукт → структурные перестройки макромолекул → биологический эффект.

Рекомендуемая литература

Кондакова Н. В. О механизме фотодинамической инактивации ферментов.— В сб.: Биоэнергетика и биологическая спектрофотометрия. М., 1967, с. 100.

Кондакова Н. В., Эйдус Л. Х. Квантовый выход фотосенсибилизированной фотоинактивации ферментов.— В сб.: Молекулярная биофизика. М., 1965, с. 217.

Grossweiner L. Molecular mechanisms in photodynamic action.— Photochem. and Photobiol., 1969, 10, 183.

Kearns D., Khan A. Sensitized photooxygenation reactions and the role of singlet oxygen.—*Photochem. and Photobiol.*, 1969, 10, 193.

Oster G., McLaren A. UV-light and photosensitized inactivation of TMV.—*J. Gen. Physiol.*, 1950, 33, 215.

Sastry K., Gordon M. The photodynamic inactivation of TMV and its ribonucleic acids by acridine orange.—*Biochim. et biophys. acta*, 1966, 129, 32.

Simon M., Vunakis H. van. The photodynamic reaction of methylene blue (MB) with DNA.—*J. Molec. Biol.*, 1962, 4, 488.

Spikes J. Photosensitization.—In: *The science of photobiology*. N. Y., 1977, p. 87.

Spikes J., Straight R. Sensitized photochemical processes in biological systems.—*Ann. Rev. Phys. Chem.*, 1967, 18, 409.

Yamamoto N. Photodynamic inactivation of bacteriophage and its inhibition.—*J. Bacteriol.*, 1958, 75, 443.

Глава XXIII. СВЕТ И ПРОИСХОЖДЕНИЕ ЖИЗНИ НА ЗЕМЛЕ

В предыдущих главах рассматривались различные аспекты взаимодействия света с существующей ныне живой материей. Ни в одном случае, однако, речь не шла о «целевом» использовании энергии света для прямого синтеза сложных органических биомолекул из простых в ходе фотохимических реакций. Функции эндоэргонического синтеза у эволюционно сложившихся форм жизни берет на себя ферментативно-матричный аппарат клеток.

Иначе обстояло дело в так называемый период химической эволюции. Для того чтобы возникли даже самые примитивные формы жизни в виде конкурирующих между собой, достраивающихся и самовоспроизводящихся полимеров, должны были так или иначе возникнуть их элементарные кирпичики — органические молекулы, такие, например, как аминокислоты, сахара и нуклеотиды. Разумеется, что синтез подобных веществ осуществлялся без участия каких-либо ферментов, для которых вообще не существовало матриц ДНК.

Выдающуюся роль в понимании механизма возникновения жизни на Земле сыграли представления, развиваемые академиком А. И. Опариным. Согласно гипотезе А. И. Опарина, синтез органических молекул из неорганических или более простых органических, связанный с ростом свободной энергии, мог осуществляться под действием естественных для той стадии развития Земли фи-

зических факторов, причем решающее значение при образовании сложных органических молекул сыграли особые структуры, получившие название коацерватных капель.

В качестве факторов, вызывающих абиогенный синтез органических молекул, рассматриваются *электрические разряды* (молнии), *высокие температуры* (горячие источники, гейзеры), *проникающая радиация и ультрафиолетовый свет*. Сейчас трудно оценить их соотносительную роль в добиотических стадиях эволюции. Тем не менее очевидно, что синтез веществ, вызываемый УФ-светом, имеет преимущества в сравнении с электро- и термосинтезом по перманентности и масштабности действия светового фактора.

Для понимания роли света в добиологической эволюции важным является тезис об отсутствии молекулярного кислорода в атмосфере первобытной Земли: жизнь возникла и сделала свои первые шаги *в бескислородной среде*. Как уже отмечалось в гл. IV, кислород обязан своим происхождением деятельности фотосинтезирующих организмов. Условиями появления фотосинтеза были серия изменений в биохимических механизмах живой системы, накопление углекислоты в окружающей среде, создание хлорофилла, переносчиков электронов и всего фотосинтетического аппарата. Помимо данных геохимии о составе первобытной атмосферы (например, восстановительный характер древних пород) существуют весомые, чисто биологические аргументы в пользу зарождения и достаточно длительной эволюции жизни в бескислородной среде. В самом деле, в организмах протекает множество биохимических реакций и превращений, отличительная особенность которых состоит в том, что они осуществляются так, чтобы любым способом избежать участия молекулярного кислорода. Как отмечают Хочачка и Самеро, основной «скелет промежуточного обмена носит строго анаэробный характер: метаболические реакции, протекающие при прямом участии кислорода, немногочисленны и к тому же представляют собой позднейшие эволюционные пристройки к уже способному функционировать анаэробному каркасу». Предполагается, что первый кислород атмосферы был своеобразным «ядом» для организмов, и они стремились его дезактивировать.

В частности, как противокислородная мера рассматривается рядом авторов возникновение биолюминесцентных реакций.

Геологические данные, хорошо согласующиеся с эволюционно-биологическими, позволили Руттену сделать вывод о том, что первичная восстановительная атмосфера, начав заменяться кислородной около 1,5 млрд. лет назад, окончательно сформировалась к периоду, отстоящему от нашего времени всего лишь на 400—500 млн. лет.

Анаэробность первобытной Земли была благоприятной для фотохимического синтеза органических веществ по следующим причинам: 1) отсутствие озонового экрана обеспечивало беспрепятственное проникновение к земной поверхности коротковолновой части спектра солнечного излучения (100—250 нм), поглощаемого простыми неорганическими и органическими молекулами и побуждающего их к фотохимическим превращениям; 2) в бескислородной среде блокировались деструктивные окислительные фотохимические реакции, с одной стороны, и затруднялось «темновое» окисление возникших органических молекул — с другой.

Некоторые представления об энергетическом вкладе УФ-радиации могут дать ориентировочные оценки Миллера для первобытной Земли (4,5 млрд. лет назад), учитывающие более высокую температуру поверхности Солнца и отсутствие ультрафиолетпоглощающего экрана над Землей. Согласно его прикидкам, поверхность Земли получала в год за счет УФ-излучения Солнца с длинами волн короче 250 нм 660 кал/см², в то время как за счет электрических разрядов в атмосфере — всего лишь 4, тепловой энергии вулканического происхождения — 0,13, ионизирующего компонента космоса — 0,8 кал/см².

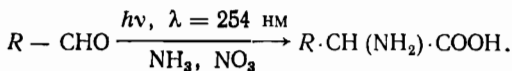
Молекулы метана, аммиака, водорода, воды, угарного и углекислого газов, синильной кислоты и некоторые другие вещества первобытной Земли обладают способностью поглощать коротковолновый УФ-свет с длинноволновой границей в области 130—220 нм. Длинноволновая граница поглощения окиси углерода лежит при 130 нм, воды — 140, метана — 147, аммиака — при 220 нм. Поглощаемые этими веществами кванты света вызывают довольно эффективные реакции фотолиза. Так, кванто-

вый выход фотолиза аммиака ($\lambda = 147$ нм) составляет 0,5, воды ($\lambda = 165$ нм) — 0,3, метана — 0,35—0,5.

Существуют прямые экспериментальные доказательства возможности абиогенного синтеза в примитивных смесях, имитирующих состав добиологической земной атмосферы, под действием УФ-лучей таких соединений, как этан, этилен, пропан, бутан, ацетилен, формальдегид, мочеви́на, гликоль. Синтез этих относительно простых низкомолекулярных соединений может рассматриваться как *промежуточный этап* синтеза более сложных биологических молекул. По мере усложнения молекулярной организации спектры поглощения сдвигаются в длинноволновую сторону, смещая красную границу фотохимически активного солнечного света. Более длинноволновым поглощением обладают и радикалы.

Образование больших количеств реакционноспособных ионов и радикалов под действием УФ-света делает вероятным их участие в темновых реакциях. Поэтому для отдельных превращений не требуется поглощение света комплексом из двух или трех столкнувшихся молекул (относительно редкое событие): ковалентная «сшивка» двух или более молекул может произойти даже через весьма значительный промежуток времени после столкновения фотохимически образовавшегося радикала с подходящим партнером. Например, коротковолновый свет вызывает фотоионизацию метана с превращением его в реакционноспособный ион CH_4^+ ; а из формальдегида фотохимически образуется формильный радикал СНО.

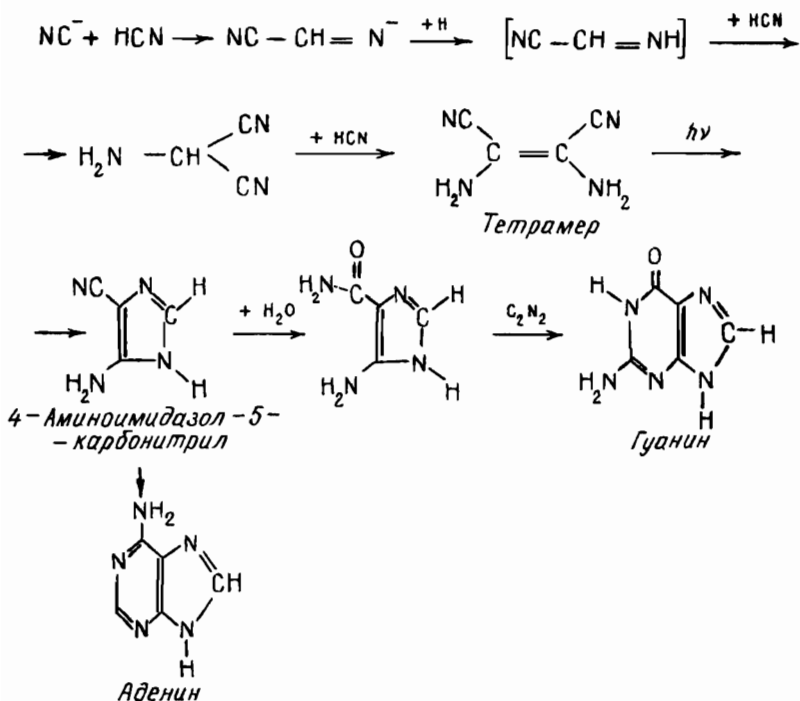
Поскольку УФ-облучение раствора формальдегида приводит к образованию сахаров (гексоз, пентоз, рибозы и дезоксирибозы), входящих, в частности, в состав нуклеиновых кислот, формальдегид можно рассматривать как предшественник в их абиогенном фотохимическом синтезе. По-видимому, формальдегид является также и предшественником аминокислот. В опытах Т. Е. Павловской и А. Г. Пасынского в УФ-облученных водных растворах формальдегида с солями аммония было зарегистрировано образование глицина, валина, аланина, глютаминовой кислоты и фенилаланина:



Подобный синтез более сложных молекул из предшественников легко идет даже под действием сравнительно длинноволнового УФ-света (254 нм).

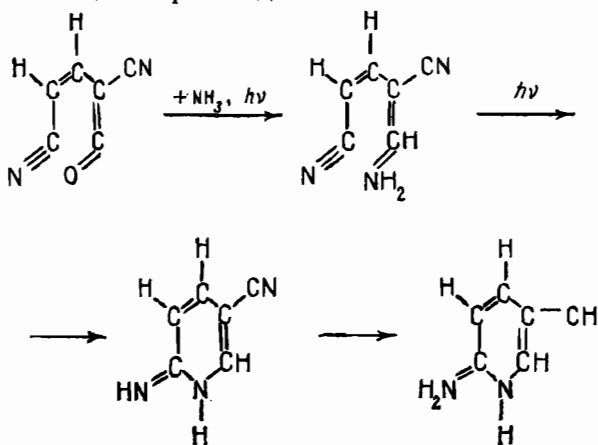
Через стадию формальдегида или ацетальдегида осуществляется и фотохимический синтез гетероциклических аминокислот и имидазола: УФ-облучение этих альдегидов совместно с азотнокислым аммонием сопровождается их накоплением в реакционной смеси.

Одним из главных предшественников сложных биологических молекул является цианистоводородная кислота, которая может существовать в трех- и тетрамерной формах. Рассмотрим, как происходит создание из тетрамера цианистоводородной кислоты некоторых биологически важных соединений. Схема синтеза пуриновых оснований из более простых предшественников может быть представлена в следующем виде:

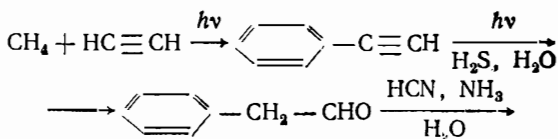


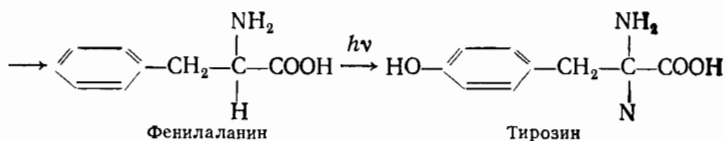
В отсутствие кислорода реакция изомеризации цианистоводородной кислоты с последующим превращением в 4-аминоимидазол-5-карбонитрил осуществляется с квантовым выходом около 0,8. Показано, что из тетрамеров цианистоводородной кислоты могут образовываться и другие пурины — гипоксантин и диаминопурин.

Производные цианистоводородной кислоты имеют отношение и к синтезу никотинамида, являющегося составной частью основного источника свободного водорода — НАД или НАДФ. Так, УФ-облучение 1,3-дициано-4-амино-1,3-бутадиена сопровождается синтезом 6-иминоникотиннитрила, в результате гидролиза которого образуются никотинамидные производные:



В качестве предшественника ароматических аминокислот — фенилаланина и тирозина — может рассматриваться фенилацетальдегид, образующийся в результате двух последовательных фотохимических реакций из метана и ацетилена через стадию фенилацетилен. В последующих темновых реакциях фенилацетальдегид превращается в фенилаланин, а после его фотогидроксилирования — в тирозин:





Синтез аминокислоты из углеводов включает три фотохимические стадии.

Таким образом, синтез существующих ныне важнейших биохимических молекул мог происходить через серии *последовательных световых и темновых абиогенных химических реакций* с участием набора предшественников, со все более сложным строением, которое постепенно приближалось к «финишному эталону», ставшему достоянием уже не химической, а биологической стадии эволюции.

Определенное значение в процессах абиогенного синтеза могли иметь *неорганические катализаторы* — глины, двухвалентное железо и медь, окислы цинка, кремния и титана.

Следует обратить особое внимание на достаточно высокие скорости фотохимических реакций, о чем свидетельствуют поражающие воображение опыты, в которых за очень незначительный по сравнению с геологическим промежутком времени (часы, сутки) удается получить из исходного строительного материала первобытной Земли такие «завершенные» продукты синтеза, как аминокислоты. Коротко остановимся на этих данных. При облучении коротковолновым ультрафиолетом (116—185 нм) компонентов первобытной атмосферы в бескислородной среде в виде смеси газов, содержащих аммиак, метан и пары воды, ряд авторов отмечали образование аминокислот. Так, Грот и Вейсенгоф, А. Н. Теренин регистрировали фотохимическое образование глицина, аланина; Н. Я. Додонова и А. И. Сидорова — валина, лейцина, норлейцина. Остаются до сих пор не выясненными механизмы этих превращений и их квантовые выходы. Тем не менее эффективность подобных превращений достаточно высока. Так, в опытах Поннамперума и Флореса за 48 ч около 0,5% метана превращалось в органические соединения.

Фотохимический синтез аминокислот может происхо-

дить не только в газообразной, но и в жидкой, водной средах. Первые указания на такую возможность были получены еще в начале нашего столетия. Позднее было показано, что при УФ-облучении в водных средах, содержащих аммиак, C_2 -соединения и некоторые соли первобытной Земли, образуются аминокислоты. Тот же результат отмечается при естественном действии лучей Солнца на растворы, содержащие формальдегид, аммиак, углекислоту и некоторые соли.

Синтез серусодержащих аминокислот происходит в тех случаях, когда в смесь метана, этана, аммиака и воды вводится сероводород. УФ-облучение такой смеси приводит к образованию не только аланина, серина, глицина, аспарагиновой и глютаминовой кислот, но и цистина.

Американским авторам удалось показать, что такие сложные органические молекулы, как порфирины, необходимые для построения хлорофилла, цитохрома и гемоглобина, могут возникать в ходе фотохимических реакций в смеси простых газов (аммиак, углекислота, метан) в водяных парах.

Еще более успешно идет синтез тетрапорфиринов из «организованных» предшественников — порфирина, пиролла и бензальдегида, особенно в присутствии ацетата цинка в качестве катализатора. В свою очередь порфобиллиноген, являющийся естественным предшественником хлорофилла в цепи его современного биосинтеза из δ -аминолевулиновой кислоты, может быть получен при ее облучении в щелочной среде.

В опытах Поннамперума и Оргеля при УФ-облучении разбавленных водных растворов цианистоводородной кислоты ($10^{-3}M$) синтезировались пуриновые основания — аденин и гуанин, а из аденозина в присутствии рибозы и этилового эфира метафосфорной кислоты — нуклеозиды (аденозин) и нуклеотиды (аденозинмоно-, -дигидро- и -трифосфат). Квантовый выход образования аденозина из аденина и рибозы составляет 10^{-5} , а нуклеотидов из нуклеозидов — 10^{-4} . Фотохимически синтезированная АТФ ничем не отличается от природных макроэргических соединений. Абиогенный, УФ-зависимый синтез дезоксиаденозина осуществлен в водных растворах аденина, дезоксирибозы и цианистого водорода.

Фотохимическое образование пиримидиновых нуклеотидов было зарегистрировано в опытах Санчеса.

Используя относительно простые углеводородные предшественники, к настоящему времени удалось продемонстрировать и возможность фотохимического синтеза липидных компонентов, например высших жирных кислот из гептана, октана и изооктана в смеси с водой и углекислым кальцием.

Итак, взяв за исходное «сырье» либо элементарные компоненты первобытной атмосферы, либо простые соединения — предшественники, в лабораторных условиях можно промоделировать световой синтез большинства биохимических молекул малых и средних размеров, включая аминокислоты и нуклеотиды — мономерные единицы двух основных классов биополимеров (белки и нуклеиновые кислоты).

Возникает вопрос: реальна ли возможность правильного фотосшивания мономеров с формированием линейных полипептидных и полинуклеотидных цепей? Согласно данным Поннамперума и Стейнмана, в УФ-облученных растворах глицина и лейцина, содержащих конденсирующие агенты цианамид и дицианамид, обнаруживаются дипептиды (глицил-глицин, глицил-лейцин, лейцил-глицин, лейцил-лейцин) с выходом 1% и некоторое количество трипептидов с выходом 0,1%, а также полиаланин. Другие авторы (Элленбоген, Стейнман с сотр., Т. Е. Павловская, Т. А. Телегина) наблюдали фотохимическое образование пептидов даже из более простых предшественников: ацетальдегида и аммонийных солей или хлористого аммония и метана в присутствии солей железа.

В опытах Т. А. Телегиной из ацетальдегида и аммония синтезировались нейтральные и основные пептиды, содержащие глицин, валин, аланин, лизин, серин, аспарагиновую и глютаминовую кислоты, причем 57% связанного азота обнаруживалось в пептидах, а 42% — в свободных аминокислотах. В среднем пептиды состояли из четырех мономерных единиц.

При фотохимической полимеризации дезоксирибонуклеотидов получались полинуклеотиды, состоящие из 12—30 мономеров, соединенных чаще всего нормальными 3,5-связями.

Таким образом, можно с достаточной уверенностью

отстаивать тезис о важной роли УФ-света при абиогенном синтезе большого ассортимента биохимических молекул, по крайней мере на химической стадии эволюции жизни на Земле. Отсутствие кислорода в атмосфере способствовало преобладанию синтетических процессов над деструктивными. Энергия квантов света использовалась не только для преодоления активационных барьеров химических превращений, но и запасалась в их продуктах, создавая условия для протекания эндергонических реакций синтеза.

Рекомендуемая литература

Додонова Н. Я., Сидорова А. И. Роль этиловых радикалов в синтезе аминокислот под влиянием вакуумной ультрафиолетовой радиации.— Биофизика, 1962, 7, 31.

Опарин А. И. Роль УФ-излучения в процессе абиогенного синтеза органических соединений в возникновении жизни на Земле.— В сб.: Биологическое действие ультрафиолетового излучения. М., 1975, с. 7.

Павловская Т. Е. Роль ультрафиолетового излучения в абиогенном синтезе биологически важных соединений.— В сб.: Эволюционная биохимия. М., 1973, с. 21.

Павловская Т. Е. Образование биологически важных соединений при действии УФ-излучения.— В сб.: Биологическое действие ультрафиолетового излучения. М., 1975, с. 10.

Происхождение жизни и эволюционная биохимия. М., 1975.

Фокс С., Дозе К. Молекулярная эволюция и возникновение жизни. М., 1975.

Хочачка П., Самеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. М., 1977.

Глава XXIV. ЛАЗЕРНОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ: БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ

Луч лазера характеризуется следующими основными свойствами: чрезвычайно высокой интенсивностью (мощностью) до 10^9 Вт в импульсе или 10^6 Вт/см²; монохроматичностью — до 10^{-7} нм; поляризованностью и когерентностью, т. е. согласованностью электромагнитных световых волн по фазе; строгой параллельностью светового пучка и его узостью (можно создать луч с поперечным сечением порядка десятых долей мкм).

Современная лазерная техника позволяет получать

очень короткие (до 10^{-12} с) световые импульсы, следующие друг за другом с различными интервалами времени с излучением в инфракрасном, видимом и ультрафиолетовом диапазонах (от 260 до 1200 нм) и самой различной плотностью потока. В основе взаимодействия мощных лазеров с живой материей лежит прежде всего прямой тепловой эффект — термическая деструкция вещества и клеток поглощаемой и диссипирующей в тепло световой энергией. Фотохимические процессы здесь имеют второстепенное значение.

Широкое использование лазерный луч в качестве светового скальпеля нашел в макро- (операции на организме) и микрохирургии (операции на клетке). В *макрохирургическом* аспекте можно упомянуть лазерное «пришивание» отслоившейся сетчатки и удаление меланом. В подобных операциях важное значение в определении места действия луча наряду с его узостью и монохроматичностью имеет пигментированность тканей-мишеней. Можно подобрать излучение с такими длинами волн, которые практически не поглощаются, а следовательно, и не повреждают все остальные ткани кроме ткани-мишени. Используется также прием искусственной сенсibilизации нужных клеток или их компонентов с помощью прокраски веществами, соответствующими по спектру поглощения лазерному излучению. В практике часто важно то, что лазерный луч, перерезая кровеносные сосуды, «заплавляет» перерезанные концы, благодаря чему уменьшаются кровопотери при операции. Особое значение это имеет при операциях на богатых сосудами тканях и органах, например на печени. Следует также отметить, что лазерный скальпель инактивирует микрофлору в местах разреза.

Русский ученый С. С. Чахотин еще в двадцатые годы нашего столетия разработал метод *микрохирургических* операций на клетке с помощью сфокусированного луча обычного ультрафиолетового света. Лазерная техника значительно расширила возможности клеточной микрохирургии, позволила избирательно повреждать разные участки цитоплазмы, ядра и хромосом, а также отдельные внутриклеточные органеллы (митохондрии, хлоропласты, лизосомы, рибосомы). Наиболее впечатляющие результаты в этой области были получены Бернсом, ко-

торому удалось достичь локального повреждения участков хромосом с размерами порядка одного гена. Отметим также данные Н. В. Сахарова, документированные микрофильмом о том, что мягкое облучение одного из двух ядрышек ядра клетки уменьшает его размеры с согласованным во времени разбуханием второго. Если же затем облучить второе ядрышко, то наблюдается обратная последовательность процессов. Такие циклы поочередного облучения обоих ядрышек с маятникообразным перекачиванием «материала» можно повторять многократно. Это указывает на существование между ними эффективных каналов взаимосвязи.

Обладает ли лазерный луч каким-либо специфическим действием на биологические объекты по сравнению с видимым светом? Естественно, что «сжигающий» эффект не обладает какой-либо биологической спецификой, а зависит только от плотности энергии. При лазерном облучении возможно двухфотонное заселение высших электронных уровней. Первые указания на возможную биологическую роль подобного рода процессов были получены Л. Б. Рубиным с сотр. На примере дрожжей, бактерий, водорослей и вирусов ими было показано, что после достижения определенной мощности лазерного импульса УФ-света (около 100 кВт/см^2) квантовый выход летального действия возрастает почти на порядок. Одновременно в опытах на ДНК в растворе при тех же мощностях зарегистрировано десятикратное увеличение квантового выхода димеризации тимина. Характерно, что, согласно специальным расчетам, при мощностях УФ-излучения, превышающих 50 кВт/см^2 , действительно создаются условия для осуществления двухквантовых фотохимических реакций. Приведенные данные, по мнению Л. Б. Рубина, указывают на то, что дважды возбужденные молекулы тимина обладают повышенной вероятностью вступления в химическую реакцию димеризации.

В сложной системе клеток, тканей и организмов возможны и вторичные проявления специфичности лазерного излучения, которые связаны с узостью зоны повреждения биосубстрата и не достигаются с помощью «широких» световых потоков, воздействующих на большой объем биологического материала. Такие эффекты могут быть обусловлены диффузией продуктов фото- и термодест-

рукции в необлученные участки клеток и тканей, локальными нарушениями проницаемости и механическими ударными волнами, имеющими место при лазерном «взрыве» биологических структур.

Специфику действия лазерного излучения на биосубстрат целесообразно связывать и с такими его параметрами, как когерентность и монохроматичность. Так, благодаря когерентной природе световой луч вызывает перемещение не только заряженных, но и незаряженных частиц. При этом частицы (макромолекулы или их комплексы) побуждаются к направленным перемещениям взаимодействием между электрическим зарядом (дипольным моментом) частицы и электрическим полем внутри лазерного пучка. Движения, не связанные с фотохимическими превращениями, в принципе, могут инициировать определенные биологические последствия, не характерные для обычного света.

Высокая монохроматичность лазерного излучения позволяет осуществлять избирательное возбуждение определенных колебательных подуровней в молекулах. Прежде всего это влияет на энергетически-конформационное состояние отдельных участков макромолекул белков и нуклеиновых кислот. В литературе описывается лазерная активация каталазы, сопряжения дыхания с фосфорилированием, иммунологических реакций. Следует, однако, заметить, что вопрос о биологически значимом специфичном действии лазерного излучения и его связи с первичными механизмами взаимодействия света с веществом еще очень далек от сколько-нибудь однозначного разрешения. Очевидно также, что подобная специфика лазерного воздействия на биологические процессы будет проявляться прежде всего при относительно слабых мощностях, не приводящих к глубокой термической деструкции биосубстрата.

В последние годы возникла и получила широкое распространение *пикосекундная спектроскопия* фотобиологических объектов, позволяющая изучать быстрые фотофизические и фотохимические реакции. Смысл пикосекундной спектроскопии — мгновенное возбуждение молекул ультракоротким лазерным импульсом с последующим тестированием другими импульсами или обычным светом кинетики релаксации системы к состоянию

равновесия, изменений физического и химического состояния по оптическим параметрам. При этом временная развертка в ультракоротких интервалах осуществляется с помощью скоростных электрооптических затворов или быстродействующих электронно-оптических преобразователей. Таким способом удалось определить время колебательных возбужденных состояний ряда органических молекул (10^{-12} — 10^{-11} с), оценить скорость первичных превращений в пигментах и родопсине. Так, по данным А. Б. Рубина, скорость наиболее быстрой реакции в фотосинтезе — разделение электрических зарядов в реакционном центре — составляет около 10^{-11} с.

Ценную информацию дают также лазерные методы спектроскопии с использованием эффектов Доплера, рамановского и рэлеевского рассеяния света, интерферометрии. В частности, по изменениям монохроматической длины волны лазерного луча при рассеянии на движущихся частицах (эффект Доплера) можно определить скорость движения биологических объектов, например клеток, клеточных органелл, потоков цитоплазмы.

Нерасходимость луча лазера существенным образом повышает разрешение индикатрисс рэлеевского рассеяния, что позволяет получить более точную информацию о размерах (молекулярных массах) и форме макромолекул и их комплексов. С помощью рэлеевского рассеяния лазерного света удалось, например, определить тонкие детали строения вируса табачной мозаики. Рамановское (комбинационное) рассеяние, связанное с изменением длины световой волны благодаря сложению или вычитанию частот колебаний электромагнитного излучения и молекулы, с успехом применяется для выяснения структурной организации молекул (белки, нуклеиновые кислоты, липиды и т. д.), межмолекулярных взаимодействий и их динамики.

В заключение нужно отметить, что лазерная техника нашла широкое применение в голографии и микроскопии. С помощью голографической интерференционной микроскопии биологических объектов и прежде всего клеток Г. Р. Иваницким с сотр. не только получено их объемное изображение, но и зарегистрированы быстрые изменения рельефа поверхности клетки (микрорельеф плазматической мембраны) и ее структур как в ходе

естественного функционирования, так и при экспериментальных воздействиях.

С помощью лазерного луча можно дистанционно изучать спектры отражения (рассеяния) от далеко расположенных объектов. Таким путем производится, например, оценка заселенности воды фотосинтезирующими организмами с палубы научно-исследовательского судна и тем самым осуществляется экспресс-определение фотосинтетической активности Мирового океана.

Рекомендуемая литература

- Гамалея Н. Ф. Лазеры в эксперименте и клинике. М., 1972.
Рубин Л. Б. Лазеры в изучении современных проблем биологии. — Сельскохозяйственная биохимия, 1977, 5, 757.
Рубин Л. Б. Лазерная техника в современной биологии. М., 1978.
Фабелинский И. Л. Новые оптические методы изучения быстротекущих процессов. — Успехи физ. наук, 1971, 1, 104.

Глава XXV. ОБЩНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

В этой главе мы постараемся привести факты в подтверждение высказанного крупнейшим советским ученым, одним из основоположников современной молекулярной биологии В. А. Энгельгардтом положения: «общности среди многообразия, а также элементов родства у явлений и закономерностей, относящихся, казалось бы, к весьма отдаленным друг от друга сферам» *). Традиционной иллюстрацией положения В. А. Энгельгардта является, например, молекулярная биология гена. Код, с помощью которого записывается и расшифровывается наследственная информация у вирусов, микроорганизмов, растений и животных, в принципе, один и тот же: одни и те же триплеты ДНК кодируют одинаковые аминокислоты.

Задача этой главы — проследить черты общности и специфичности разнообразных фотобиологических процессов, рассмотренных в предыдущих главах.

*) Энгельгардт В. А. Часть и целое в молекулярной биологии. М., Знание, 1973, с. 4.

Разумеется, свет не несет наследственную информацию, лежащую в основе индивидуального и эволюционного развития. Тем не менее он является важнейшим фактором внешней среды, с которым так или иначе взаимодействуют все формы живой материи. И самое главное — свет практически единственный внешний источник энергии для всей биосферы. Вторая важнейшая функция света — информационная. Со светом связано большое количество и других разнообразных биологических эффектов. Отсюда вытекают два важнейших вывода: 1) для фотобиологии в целом должно быть характерно большее многообразие, чем для «одноплановых», структурно-функциональных реакций (например, генетических), имеющих только одну биологическую задачу; 2) большего единообразия следует ожидать внутри однотипных фотобиологических реакций (например, фотосинтез).

К этим двум выводам можно добавить еще один. Поскольку все фотобиологические реакции начинаются со взаимодействия кванта света с веществом, приводящего к возникновению электронно-возбужденных состояний, наиболее выраженная общность всех реакций проявляется на их первых этапах. На последующих стадиях происходит специфическое разветвление процессов, приводящее к множественности путей реализации.

Итак, отправной точкой всей фотобиологии является свет, поглощенный молекулами биосубстрата и переведший их в электронно-возбужденное состояние. Электронно-возбужденные состояния возникают либо в результате поглощения кванта света самой молекулой (прямое возбуждение), либо вследствие миграции энергии от соседних молекул (косвенное возбуждение). Миграция энергии увеличивает поперечное сечение биологически активного поглощения (точнее, элементарного акта фотобиологической реакции), как это наблюдается, например, при фотосинтезе, где многие молекулы-светосборщики работают на одну молекулу реакционного центра. В других случаях миграция энергии выполняет защитную функцию. Например, перенос энергии от нуклеотидов ДНК к тирозину белков в хроматине снижает эффективность повреждающего действия УФ-света на геном,—

поперечное сечение биологически активного поглощения уменьшается.

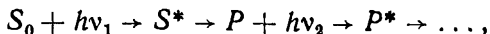
Возникшие тем или иным способом возбужденные молекулы реализуют свою активность фотохимическим путем с участием синглетных и триплетных состояний.

Не исключена возможность и иного, «теплого» пути (тепловая диссипация), при котором в большей или меньшей степени наблюдается избирательный микроразогрев материала вокруг хромофора, что может привести к разрыву водородных, гидрофобных и других слабых связей и, как следствие, к конформационным перестройкам макромолекулы или даже мембраны.

Однако, как правило, в основе фотобиологии лежат именно фотохимические реакции. Для их осуществления обычно достаточно одного кванта света (одноквантовый процесс). Первичные фотохимические реакции, требующие двух квантов и начинающиеся от второго триплетного возбужденного состояния по схеме



в фотобиологии носят эпизодический характер. Подчиненное значение в фотобиологии имеют также двухквантовые процессы типа



где второй квант поглощается не триплетным состоянием, а лабильным или стабильным фотопродуктом, как это имеет место в фотохимии липидов или на заключительных стадиях биосинтеза хлорофилла.

Первичные фотохимические реакции многообразны и охватывают почти все превращения, рассмотренные в гл. II. На стадии образования первичных фотопродуктов возникает одна из трех ситуаций: либо хромофор претерпевает чисто внутримолекулярные химические перестройки, а соседние молекулы остаются химически неизменными (например, *цис-транс*-изомеризация 11-*цис*- и 13-*цис*-ретинала в родопсине и бактериородопсине соответственно); либо после быстрых и обратимых превращений хромофор не изменяется, а химические перестройки испытывает другая близлежащая молекула (такая фотокаталитическая функция хромофора свойственна хлорофиллу при фотосинтезе и красителю при фотодинамическом эффекте); либо изменяются одновременно и хромофор

и соседняя (или соседние) молекула. Последней может быть биологическая молекула того же (димеры тимина, цитозина, урацила) или другого (димеры тимин-цитозина, цитозин-урацила) типа, а также неорганические молекулы: H_2O , O_2 (гидрат урацила, превращение $-\text{S}-\text{S}- \rightarrow 2\text{SH}$ в белках, протохлорофиллид $\rightarrow$ хлорофиллид при биосинтезе хлорофилла).

В результате первичной фотохимической реакции, как правило, образуется свободный радикал. Известно три основных вида лабильных свободнорадикальных продуктов: катион-радикал, анион-радикал и нейтральный радикал. Благодаря неспаренным электронам свободные радикалы обладают высокой реакционной способностью.

In vitro известны также цепные свободнорадикальные фотохимические реакции, имеющие квантовые выходы вплоть до 10^6 , однако *in vivo* такие реакции пока не обнаружены. Возможно, известное исключение из правила составляет перекисное окисление липидов, индуцируемое УФ-светом. Тем не менее ряд фотохимических реакций в клетке может идти с квантовым выходом, близким к единице (восстановление хлорофиллом переносчиков электронов, *цис-транс*-изомеризация ретиналя в сетчатке). Подобная ситуация характерна и для хромофоров, практически не обладающих способностью к флуоресценции. Поскольку квантовый выход фотохимической реакции (ϕ) определяется соотношением констант скоростей (вероятностей) фотохимического ($K_{\text{ф}}$), люминесцентного ($K_{\text{л}}$) и термодиссипативного ($K_{\text{т}}$) путей дезактивации электронно-возбужденного состояния в соответствии с соотношением

$$\phi = \frac{K_{\text{ф}}}{K_{\text{ф}} + K_{\text{л}} + K_{\text{т}}},$$

то при $\phi \approx 1$ скорость фотохимической реакции должна значительно превышать скорость диссипации энергии в тепло. Например, времена превращения родопсина в прелюмиродопсин и разделения зарядов в реакционном центре фотосинтеза лежат в пикосекундном интервале.

В биологическом эксперименте можно определять как квантовый выход образования первичного лабильного фотопродукта, так и квантовый выход образования всех промежуточных продуктов вплоть до стабильного. В слу-

чае, если конечный биологический макроэффект подчиняется закону «все или ничего» (гибель клетки, мутация, зарождение импульса в фоторецепторной клетке), можно ввести понятие квантового выхода биологической реакции

$$\Phi' = \frac{\text{число убитых клеток}}{\text{число поглощенных клетками квантов}}.$$

Величина квантового выхода бактерицидного действия характеризуется весьма низкими значениями: $\Phi = 10^{-5} - 10^{-7}$. Однако экспоненциальная зависимость доли выживших клеток от дозы света указывает на то, что к гибели клетки приводит поглощение одного-единственного кванта света, т. е. ничтожной энергии (около 10^{-21} ккал) достаточно для того, чтобы убить целую клетку. Иными словами, всего одна молекула «критического» фотопродукта способна реализоваться в конечный макроэффект — гибель клетки. В этом случае квантовые выходы образования критического (но не общего) фотопродукта и макроэффекта должны быть одинаковыми.

С точки зрения термодинамики все фотохимические реакции подразделяются на две категории: 1) эндергонические реакции, продукты которых имеют большие запасы свободной энергии, чем исходное вещество; в них запасается часть энергии квантов света (парциальные фотохимические реакции и фотосинтез в целом, бактериородопсиновый синтез АТФ); 2) экзергонические реакции, в которых энергия света не запасается в продуктах реакции, а нужна для преодоления активационного барьера (большинство фотохимических реакций).

Следовательно, в первом случае квант света «ценен» для клетки как источник свободной энергии, которая надолго и прочно утилизируется в форме богатых энергией химических продуктов (АТФ, сахара и т. д.), во втором — энергия кванта света берется лишь на время, «взаймы», для преодоления активационного барьера, конструирования активированного комплекса, причем после завершения фотохимической реакции она вновь отдается окружающей среде в виде тепла.

Чрезвычайно важно, что во всех случаях энергия, необходимая для преодоления активационного барьера

при «изготовлении» активных молекул, берется в основном не в тепловой форме, а в виде энергии света. Именно поэтому фотохимические реакции, в которых, как и в темновых реакциях, происходит химическое изменение вещества, сопряженное с преодолением энергетических барьеров, имеют ничтожно малые значения энергии (энтальпии) активации. Их скорости практически не зависят от температуры ($Q_{10} \approx 1$) и целиком определяются концентрацией возбужденных молекул.

Причинами невыполнения этого общего правила могут быть следующие: 1) зависимость вероятностей тепловой дезактивации, $S \rightarrow T$ -интерконверсии и люминесценции от температуры. Поскольку указанные процессы обычно идут с преодолением неодинаковых по величине энергетических барьеров, квантовый выход фотохимической реакции, складывающийся из соотношения вероятностей конкурирующих между собой различных путей дезактивации одной и той же возбужденной молекулы, может зависеть от температуры; 2) стерический, ориентационный фактор, существенный для биомолекулярных реакций. Для того чтобы реакция произошла, возбужденная и невозбужденная молекулы должны быть в момент столкновения ориентированы соответствующим образом. Поэтому при температурах замерзания образцов, где трансляционное и релаксационное движение молекул ограничено, правильно ориентированные молекулы быстро расходятся и при дальнейшем облучении реакция практически не идет ($\phi \approx 0$), как это имеет место при димеризации оснований в замороженных образцах; 3) температурно-зависимые, кооперативные конформационные переходы биополимеров (денатурационные и функциональные), в ходе которых меняются ориентация центров, микроокружение фотохимически активных хромофоров и устойчивость макромолекулы к фотопродуктам. Например, конформеры одних и тех же белков могут различаться по квантовым выходам фотоинактивации почти в 2 раза.

Совершенно очевидно, что в сложной цепи фотобиологических реакций, включающих наряду с первичными фотохимическими стадиями большее или меньшее число темновых химических реакций, скорость суммарного процесса (грубо говоря, время между световым импульсом

и конечной биологической реализацией света) сильно зависит от температуры. Суммарный процесс будет иметь энергию активации самой медленной лимитирующей стадии в цепи консекитивных реакций. При неизбежных потерях первичных или промежуточных фотопродуктов от температуры будет зависеть и квантовый выход фотобиологической реакции в целом. Так, температура, воздействуя на скорость деления клеток и активность ферментов репарации ДНК, влияет и на эффективность бактерицидного или мутагенного действия света в результате изменения концентрации димеров тимины.

Другой пример. Температурный коэффициент Q_{10} скорости фотосинтеза на интенсивном свете равен 2,5, а на слабом — 1,2. В первом случае скорость суммарного процесса лимитируется темновой (биохимической), во втором — фотохимической стадией, термически не активируемой.

Следует подчеркнуть, что вероятность вступления синглетной или триплетной возбужденной молекулы в определенную фотохимическую реакцию зависит не только от количества запасенной энергии в ней, достаточного или недостаточного для преодоления энергетического барьера, но и еще, по крайней мере, от двух факторов: характера распределения электронной плотности (прежде всего валентных электронов) и в меньшей степени от расположения ядер, с одной стороны, и времени жизни возбужденных состояний — с другой. Например, разрыв 5,6-двойной связи с образованием циклобутановых димеров по 5- и 6-углеродным атомам определяется рассмотренными ранее специфическими особенностями электронного облака в этой области у первого триплетного состояния. Очевидно также, что при прочих равных условиях вероятность фотохимического превращения вещества тем выше, чем больше время жизни электронно-возбужденного состояния. Из сказанного выше следует еще один важный вывод: первичной «мишенью» действия света являются не ядра или электроны внутренних орбит, а валентные электроны.

Таким образом, вероятность, а следовательно, квантовый выход фотохимического превращения молекул определяются тремя показателями: запасами энергии,

электронно-ядерной архитектурой и временем жизни возбужденных состояний. По всем показателям синглетные и триплетные состояния различаются.

Обратим внимание еще на одну характерную особенность фотохимических реакций. Обычно все метаболические превращения в клетках носят ферментативный характер. В противоположность этому первичные фотохимические реакции не катализируются какими-либо специализированными ферментами. (Это не ферментативные реакции.) Единственным известным исключением из правила является фотореактивирующий энзим. Он способен образовывать фермент-субстратный комплекс с ДНК в темноте и быть катализатором лишь при освещении (мономеризация димера тимина). Кроме того, фотореактивирующий энзим представляет собой единственный достоверный пример, когда в каталитическом акте участвуют электронно-возбужденные состояния.

Большинство биологических хромофоров, участвующих в фотохимических превращениях, соединены ковалентными или нековалентными связями с белковым носителем, который оказывает определенное влияние на ход фотохимических превращений. Так, с одной стороны, протохлорофиллид легко превращается в хлорофиллид в связанном с белком состоянии (протохлорофиллид — го-лохром), будучи фотохимически менее активным в свободном виде. Сказанное справедливо и для фотопревращений билитриеновой группировки фитохрома. С другой стороны, фотохимические перестройки хромофора приводят к конформационным модификациям белка-носителя (опсина в родопсине, белка фитохрома).

Итак, кванты света участвуют в жизненных процессах, как правило, через стабильные фотопродукты: $h\nu \rightarrow$ первичный лабильный продукт $\rightarrow$ стабильный фотопродукт $\rightarrow$ биологический эффект. Стабильный продукт активно включается в метаболические процессы одним из двух возможных путей: является непосредственным участником биохимических, метаболических реакций, например в качестве субстрата ферментативных реакций или интермедиата биосинтезов (образование хлорофиллида; АТФ и НАДФН₂ при фотосинтезе; синтез витамина D и т. д.); непосредственно не участвуя в биохимических реакциях, он меняет конформацию либо биополиме-

ров (их активный центр), либо даже самой мембраны, модифицируя тем самым ферментативную, матричную (или иную) активность биополимеров и барьеры проницаемости (фотолиз триптофанилов и —S—S—связей в белках, *цис-транс*-изомеризация ретиналя в сетчатке, димеризация и гидратация пиримидиновых оснований ДНК или РНК и т. д.).

Первый путь характерен для биосинтетических и энергетических, второй — для информационных и деструктивно-модифицирующих реакций. В конечном счете при любой фотобиологической реакции стабильный продукт способен приводить к изменениям морфологии, физиологии и характера движения организмов только через посредство метаболических, биохимических сдвигов. Ведь даже мутационные изменения ДНК реализуются только через биосинтез белка и последующие метаболические сдвиги.

Специфический аппарат, выработанный в ходе эволюции и предназначенный для реализации действия фотопродуктов и стыковки их с основными процессами жизнедеятельности, обычно представлен в физиологических реакциях, а в повреждающих, деструктивных, отсутствует. Здесь сдвиги в метаболизме наступают вследствие прямого повреждения жизненно важных биологических структур (ДНК, РНК, белков, мембраны), которые уже не выполняют или выполняют неправильно свои обычные темновые функции. Более того, для самого уникального и ключевого биополимера (ДНК) природа позаботилась о создании «антиусилительного», «ослабительного» аппарата, включающего несколько реагирующих систем, которые активно устраняют фотохимические дефекты макромолекулы.

Во избежание недоразумений следует оговориться, что в ходе эволюционного развития репарационные механизмы возникли, скорее всего, как противоядие против порчи генетического аппарата не только ультрафиолетом, но и проникающей радиацией, химическими веществами и спонтанными ошибками в ходе редупликации генетического материала (радиационный, химический и спонтанный мутагенез). Вместе с тем некоторые из них (например, SOS-система), по-видимому, приводят к появлению ошибок в ходе устранения дефектов, а возникающие

при этом мутации способствуют выживанию популяции в экстремальных условиях.

Возвращаясь к физиологическим фотореакциям, отметим, что естественный отбор сконструировал и изготовил специализированные механизмы реализации действия света двух типов: с усилением и без него. Последний работает, например, в фотосинтезе (транспорт электронов с фотосинтетическим фосфорилированием), который с известными энергетическими потерями запасает в органических молекулах лишь часть энергии света (около 30—40%).

Усилительные механизмы в наиболее выраженной и совершенной форме представлены в информационных фотобиологических реакциях, в первую очередь в зрительных. Здесь достаточно попадания в зрительную клетку сетчатки глаза одного или нескольких квантов света, чтобы в нервном волокне возник спайк. Как и в самом совершенном радиоэлектронном устройстве, в этом случае коэффициент усиления по мощности достигает 10^5 — 10^6 .

Завершающей стадией любой фотобиологической реакции является конечный макроэффект (синтез органического вещества, движение биообъекта, изменение наследственных свойств организма, гибель клетки и т. д.). Макроэффект может быть достигнут либо сразу после поглощения эффективной дозы света, либо спустя более или менее длительный промежуток времени (лаг-фаза). Продолжительность лаг-фазы определяется не столько фотофизическими и фотохимическими стадиями, сколько аппаратом реализации: его сложностью, числом стадий, оперативностью работы (кинетическими параметрами). Разумеется, что продолжительность лаг-фазы будет в сильной степени зависеть и от внешних условий (температура, состав окружающей среды и т. д.).

Таким образом, рассмотрены все основные стадии фотобиологических реакций: фотофизика, первичная фотохимия, лабильные и стабильные фотопродукты, механизмы реализации и конечный биологический эффект. На многочисленных примерах показано, что даже разнотипные реакции (энергетические, биосинтетические, информационные, деструктивно-модифицирующие) при всем их разнообразии внутренне едины. В еще большей

степени это справедливо для однотипных реакций, характеризующихся, как правило, идентичными хромофорами с близкой фотофизикой и фотохимией, а также сходными механизмами реализации. Эти моменты отмечены в соответствующих главах. Внутреннее единство самых разнообразных фотобиологических процессов становится еще более очевидным при рассмотрении роли мембран в фотобиологии.

Следует еще раз напомнить, что большинство хромофоров включено в состав мембран или ассоциировано с ними. Специфика микроокружения хромофора в мембране оказывает существенное влияние на ход фотофизических и фотохимических реакций. Так, включение хромофоров в состав мембран приводит к значительным изменениям параметров поглощения и люминесценции.

Серьезные конформационно-зависимые модификации претерпевают и фотохимические реакции. Например, квантовые выходы инактивации ацетилхолинэстеразы в свободном состоянии и в составе мембраны значительно различаются между собой. Мембрана тормозит фотоокисление липидов; изменение энтропии активации перехода люмиродопсин $\rightarrow$ метародопсин I в мембранах палочек в 2 раза меньше, чем в дигитониновых экстрактах. Следовательно, мембрана может ускорять или замедлять фотохимические реакции и даже менять их направление в зависимости от биологической «целесообразности».

Кроме того, способность мембран существовать в нескольких дискретных конформационных состояниях с кооперативными переходами между ними открывает эффективный путь регуляции фотобиологических процессов. Свет также способен инициировать подобные переходы, причем конформационные перестройки могут выступать в роли механизма темнового усиления.

Наиболее правдоподобной представляется следующая картина. Квант света вызывает фотохимические изменения встроенной в мембрану молекулы, в результате чего ее стереометрия сильно нарушается: продукт уже не соответствует той структурной ячейке в мембране, которую занимала ранее исходная, немодифицированная, молекула. Образовавшееся «инородное» тело создает эффект локального «механического напряжения», вызывающего волну распространяющихся по мембране структур-

ных преобразований. Благодаря этому становится возможным выраженное дальноедействие: продукт контролирует структурное и функциональное состояние различных участков мембраны, пространственно удаленных от места протекания фотохимической реакции,— феномен фотохимической аллотопии.

В ходе эволюции природа предусмотрела своеобразные отношения между стабильным фотопродуктом и мембраной, которые можно было бы назвать принципом «антикомплементарности»: в процессе фотохимической реакции возникают нарушения геометрических параметров взаимодействия исходной молекулы и образовавшегося стабильного фотопродукта, ответственного за дальнейшие биологические последствия, с мембраной.

Отнюдь не случайно, что в основе наиболее совершенной, информационной фотобиологической реакции (зрение у животных) лежит фотохимическая реакция *цис-транс*-изомеризации. Для этой реакции характерны высокая эффективность и легкая обратимость. Более того, изомеризация хромофора благодаря значительным изменениям его стереометрии может быть причиной наиболее глубоких изменений в конформации носителя (белок, липопротеидный комплекс, мембрана), что является опорной точкой механизмов усиления.

Эта мысль подтверждается модельными опытами, выполненными за последние годы. *Цис*- и *транс*-формы красителя, комплексирующегося с холинэстеразой и трипсином в растворе, обладают явно неодинаковой ингибирующей ферменты активностью. В итоге свет, индуцирующий обратимые *цис-транс*-переходы, регулирует уровень ферментативной активности белкового носителя. По данным И. В. Березина и др., *цис*-форма комплекса циннамоил- α -химотрипсина лишена ферментативной активности. При фото-*транс*-изомеризации циннамоила происходит отрыв ингибитора и восстановление нормального уровня активности. Более того, аналогичная регуляция воспроизводится при комплексовании красителя с клеточной мембраной: *цис-транс*-переходы, очевидно, через обратимые конформационные перестройки мембраны изменяют ее проницаемость. Фотоиндуцированные изменения проницаемости четко зарегистрированы на искусственных фосфолипидных мембранах после включения в них таких биологически активных хромофоров или их комплексов, как родопсин, фитохром и флавины.

Таким образом, внутренняя взаимосвязь между молекулярными и мембранными аспектами фотобиологических процессов достаточно отчетлива. Квант света ини-

цирует структурные перестройки мембран, а их исходное состояние сильно влияет на фотофизические, фотохимические и «реализационные» реакции.

С одной стороны, в мембране в строгом порядке размещены как хромофоры, так и молекулярные партнеры фотохимических превращений; с другой — в ней устанавливается специфика и уровень межмолекулярных взаимодействий. Наконец, мембрана выступает в роли своеобразной сетки в триоде, усиливающей через изменения барьера проницаемости небольшие фотохимические сигналы. Можно думать, что именно мембранный уровень определяет во многих случаях широкую вариабельность эффективности действия света на биологические объекты, зависящую от многих факторов внешней среды: температуры, солевого состава, питания и т. д. Становится все более очевидным также, что регуляция эффективности фотобиологических реакций осуществляется главным образом на мембранном уровне.

УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

Евстигнеев В. Б.— В сб.: Элементарные фотопроцессы в молекулах. М., 1966, с. 243.

Потапенко А. Я., Рощупкин Д. И., Когон Е. А., Владимиров Ю. А.— Докл. АН СССР, 1972, 202, 882.

Рубин А. Б.— В кн.: Биофизика фотосинтеза. М., 1975, с. 145.

Blum H.— In: Biophysical research methods. N. Y., 1950, p. 417.

Brandt C., Giese A.— J. Gen. Physiol., 1956, 39, 735.

Brown P., Wald G.— Science, 1964, 144, 45.

Butler W., Hendricks S., Siegelman H.— In: Chemistry and biochemistry of plant pigments. N. Y., 1965, p. 197.

Claes H.— Photochem. and Photobiol., 1966, 5, 515.

Cook J.— J. Cell Comp. Physiol., 1956, 47, 55.

Curry G., Gruen H.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1959, 45, 797.

Diehn B.— Biochim. et biophys. acta, 1969, 177, 136.

Emerson R., Lewis C.— Am. J. Bot., 1943, 30, 165.

Franklin R.— Biochim. et biophys. acta, 1954, 13, 137.

French C.— In: This is life. N. Y., 1962, p. 3.

Halldal P.— Plant. Physiol., 1961, 14, 133.

Hanawalt P., Setlow K.— Biochim. et biophys. acta, 1960, 41, 283.

Haxo F., Blinks L.— J. Gen. Physiol., 1950, 33, 389.

Haxo F., O'Heocha C., Norris P.— Arch. Biochem. Biophys., 1955, 54, 162.

Hendricks S., Siegelman H.— In: Comprehensive biochemistry. N. Y., 1967, v. 27, p. 211.

Hollaender A.— Biol. Bull., 1938, 75, 248.

Jagger J.— Photochem. and Photobiol., 1964, 3, 451.

Johnson B., Daniels F. (Jr.), Magnus I.— In: Photophysiology. N. Y., 1968, v. 4, p. 139.

Kleczkowski A., Govier D.— Photochem. and Photobiol., 1969, 10, 53.

Lamola A.— Nature, 1968, 7, 619.

Lees A.— Nature, 1960, 210, 986.

McLaren A., Shugar D. Photochemistry of proteins and nucleic acids. Oxford, 1964, p. 372.

Mohr H.— Photochem. and Photobiol., 1966, 5, 469.

Mohr H. Lehrbuch der Pflanzenphysiologie. Berlin, 1969.

Pamper S., Atwood K.— In: Radiation biology. N. Y., 1955, v. 2, p. 431.

- Pathak M., Riley F., Fitzpatrick T., Curwen W.—*Nature*, 1962, **193**, 148.
- Rau W.—*Planta*, 1967, **72**, 14.
- Raut C., Simpson W.—*Arch. Biochem. Biophys.*, 1955, **57**, 218.
- Sanders R., Giese A.—*J. Gen. Physiol.*, 1959, **42**, 589.
- Schmid G., Gaffron H.—*Photochem. and Photobiol.*, 1971, **14**, 451.
- Setlow R.—*Biochim. et biophys. acta*, 1961, **49**, 237.
- Setlow R., Doyle B.—*Biochim. et biophys. acta*, 1957, **24**, 27.
- Thimann K.—In: *Comprehensive biochemistry*. N. Y., 1967, v. 27, p. 243.
- Thimann K., Curry G.—In: *Comparative biochemistry*. N. Y., 1960, v. 2, p. 243.
- Toole E., Hendricks S., Borthwick H., Toole V.—*Ann. Rev. Plant Physiol.*, 1956, **7**, 299.
- Vernon L., Shaw E., Ogawa I., Raveed D.—*Photochem. and Photobiol.*, 1971, **14**, 343.
- Wald G., Brown P.—*Science*, 1958, **127**, 222.
- Witkin E.—*Bacteriol. Rev.*, 1977, **40**, 869.
- Witt H.—*Quart. Rev. Biophys.*, 1971, **4**, 365.
- Wolken J., Shin E.—*J. Protozool.*, 1958, **5**, 39.
- Zirkle R., Uretz P.—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1963, **49**, 45.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
Глава I. Взаимодействие света с веществом	5
1. Природа света	5
2. Законы поглощения света	6
3. Внутренняя конверсия	12
4. Флуоресценция	13
5. Интеркомбинационная конверсия, триплетные состояния и фосфоресценция	18
6. Миграция энергии	19
Рекомендуемая литература	29
Глава II. Общая характеристика фотохимических реакций	29
1. Основные закономерности фотохимии	29
2. Типы фотохимических реакций	32
Рекомендуемая литература	35
Глава III. Систематика и общая характеристика фотобиологических реакций и их основных стадий	35
Глава IV. Фотосинтез	41
1. Итоговая реакция фотосинтеза	42
2. Термодинамика фотосинтеза	43
3. Квантовый и энергетический выход фотосинтеза	45
4. Структура фотосинтетического аппарата	46
5. Фотофизические стадии фотосинтеза	49
6. Фотохимические стадии фотосинтеза	62
7. Две фотосистемы. Транспорт электронов	66
8. Фотосинтетическое фосфорилирование	82
9. Расщепление воды и выделение кислорода	85
10. Гипотеза о трех фотореакциях и двух фотосистемах в фотосинтезе	87
11. Особенности бактериального фотосинтеза	89
12. Эффективность запасаания энергии света на стадии транспорта электронов	90
13. Ферментативная темновая стадия фотосинтеза (метаболизм углерода)	93
14. Роль мембранной организации фотосинтетического аппарата	98
15. Механизмы регуляции фотосинтеза	108
Рекомендуемая литература	109

Глава V. Бактериородопсиновый фотосинтез макроэргов	110
Рекомендуемая литература	119
Глава VI. Зрение	119
1. Общая характеристика фоторецепции	120
2. Зрительные пигменты	125
3. Фотофизика и фотохимия зрительной рецепции	129
4. Механизмы реализации фотохимических превращений родопсина в фоторецепторный сигнал	137
5. Цветное зрение	146
6. Зрение беспозвоночных	149
Рекомендуемая литература	151
Глава VII. Фототаксис и фотокинез	152
1. Фототаксис	152
2. Фотокинез	161
Рекомендуемая литература	163
Глава VIII. Фототропизм	163
Рекомендуемая литература	175
Глава IX. Фотоморфогенез	175
1. Спектры действия и фитохром	176
2. Механизмы усиления	184
3. Соотношение между высоко- и низкоэнергетическими морфогенетическими реакциями	190
Рекомендуемая литература	193
Глава X. Хронобиология и фотопериодизмы	194
1. Циркадные ритмы	195
2. Фотопериодические реакции у растений	196
3. Фотопериодические реакции у животных	197
Рекомендуемая литература	202
Глава XI. Фотобиосинтетические реакции	202
1. Хлорофилл	203
2. Каротиноиды	212
3. Антоцианы	217
4. Факторы, стимулирующие размножение микроорганизмов	218
5. Витамин D	219
Рекомендуемая литература	221
Глава XII. Действие ультрафиолетового света на нуклеиновые кислоты	222
1. Природа и характеристика электронно-возбужденных состояний пуриновых и пиримидиновых оснований	222
2. Миграция энергии	223
3. Типы фотохимических реакций	226
4. Димеризация тимина	227

5. Димеризация тимина в обезвоженных пленках и спорах	233
6. Димеризация урацила	233
7. Димеризация цитозина	234
8. Смешанная димеризация оснований	235
9. Пиримидиновые аддукты	235
10. Гидратация урацила и цитозина	236
11. Таутомеризация оснований	237
12. Разрывы полинуклеотидной цепи	238
13. Внутри- и межмолекулярные поперечные сшивки в ДНК	238
14. Сшивки нуклеиновая кислота — белок	239
15. Денатурация нуклеиновых кислот	241
16. Биологическое значение повреждений нуклеиновых кислот	242
Рекомендуемая литература	245
 Глава XIII. Действие ультрафиолетового света на белки	245
1. Характеристика электронно-возбужденных состояний белковых хромофоров	246
2. Общая характеристика фотонинактивации белков	248
3. Роль отдельных хромофоров в фотонинактивации белков	249
4. Миграция энергии в белках	253
5. Триптофановая фотонинактивация	256
6. Цистиновая фотонинактивация	264
7. Другие виды повреждений белка	266
8. Роль конформационного фактора в фотонинактивации белков	267
9. Особенности фотонинактивации белков в составе биологических мембран	268
10. Фотоактивация белков	270
Рекомендуемая литература	270
 Глава XIV. Действие ультрафиолетового света на липиды	271
Рекомендуемая литература	275
 Глава XV. Летальное действие света	276
1. Общая характеристика эффекта	276
2. Инактивация фагов и плазмид	278
3. Инактивация клеток	282
Рекомендуемая литература	287
 Глава XVI. Ингибирование макромолекулярных синтезов	288
Рекомендуемая литература	291
 Глава XVII. Репарация фотоповреждений в клетке	292
1. Фотореактивация	292
2. Фотопротекция	297
3. Темновая репарация	298
Рекомендуемая литература	304

Глава XVIII. Мутационные и рекомбинационные процессы .	305
1. Мутации	305
2. Рекомбинация	311
Рекомендуемая литература	313
Глава XIX. Лизогения	313
Рекомендуемая литература	316
Глава XX. Загар и фотобиологические реакции в коже . .	316
1. Эритема	318
2. Эдема	321
3. Пигментация кожи (загар)	321
4. Канцерогенез	325
Рекомендуемая литература	327
Глава XXI. Световые болезни клеток	327
1. Ингибирование процессов движения и размножения клеток	329
2. Ультрафиолетовый свет и проницаемость биологических мембран	332
Рекомендуемая литература	337
Глава XXII. Фотодинамическое действие	337
1. Общая характеристика	337
2. Липиды	344
3. Белки	345
4. Нуклеиновые кислоты	347
5. Вирусы и клетки	348
6. Многоклеточные организмы	349
Рекомендуемая литература	350
Глава XXIII. Свет и происхождение жизни на Земле . .	351
Рекомендуемая литература	360
Глава XXIV. Лазерное излучение: биологическое действие и применение	360
Рекомендуемая литература	365
Глава XXV. Общность и специфичность фотобиологических реакций	365
Указатель литературы к иллюстрациям	378

Сергей Васильевич Конев
Игорь Дмитриевич Волотовский

ФОТОБИОЛОГИЯ

Издание второе, переработанное
и дополненное

Редактор *Т. А. Акулович*. Младшие редакторы *В. В. Прокурова*, *С. О. Татрышвили*. Оформление художника *Э. Э. Жакевича*. Художественный редактор *Л. Г. Медведева*. Технический редактор *В. П. Безбородова*. Корректоры *Л. В. Лебедева*, *В. А. Жданович*

ИБ № 267

Сдано в набор 25.09.78. Подписано в печать 16.04.79. АТ 00080. Формат 84×108¹/₃₂. Бумага типографская № 1. Гарнитура литературная. Высокая печать. Усл. печ. л. 20,16. Уч.-изд. л. 20,39. Тираж 2000 экз. Заказ 1202. Цена 95 коп. Издательство Белорусского государственного университета им. В. И. Ленина. Минск, Парковая магистраль, 11. Дом книг. Ордена Трудового Красного Знамени типография издательства ЦК КП Белоруссии. Минск, Ленинский пр., 79