

# ФОТОБИОФИЗИКА

Учебная программа дисциплины

➤ Учебное пособие

Методические указания по самостоятельной работе

Банк тестовых заданий в системе UniTest



УДК 577  
ББК 28.071  
Ф74

Авторы:

**И. Е. Суковатая, В. А. Кратасюк, В. В. Межевикин, И. В. Свидерская,  
Е. Н. Есимбекова, Е. В. Немцева**

Электронный учебно-методический комплекс по дисциплине «Фотобиофизика» подготовлен в рамках инновационной образовательной программы «Институт фундаментальной подготовки», реализованной в ФГОУ ВПО СФУ в 2007 г.

Рецензенты:

Красноярский краевой фонд науки;

Экспертная комиссия СФУ по подготовке учебно-методических комплексов дисциплин

Ф74      Фотобиофизика. Версия 1.0 [Электронный ресурс] : электрон. учеб. пособие / И. Е. Суковатая, В. А. Кратасюк, В. В. Межевикин и др. – Электрон. дан. (9 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2008. – (Фотобиофизика : УМКД № 141-2007 / рук. творч. коллектива В. А. Кратасюк). – 1 электрон. опт. диск (DVD). – Систем. требования : *Intel Pentium* (или аналогичный процессор других производителей) 1 ГГц ; 512 Мб оперативной памяти ; 9 Мб свободного дискового пространства ; привод *DVD* ; операционная система *Microsoft Windows 2000 SP 4 / XP SP 2 / Vista* (32 бит) ; *Adobe Reader 7.0* (или аналогичный продукт для чтения файлов формата *pdf*).

ISBN 978-5-7638-0890-2 (комплекса)

Номер гос. регистрации в ФГУП НТЦ «Информрегистр» 0320802751 от 22.12.2008 г. (комплекса)

Настоящее издание является частью электронного учебно-методического комплекса по дисциплине «Фотобиофизика», включающего учебную программу, методические указания по самостоятельной работе, контрольно-измерительные материалы «Фотобиофизика. Банк тестовых заданий», наглядное пособие «Фотобиофизика. Презентационные материалы».

Рассмотрены основные закономерности и механизмы действия света на биологические системы различной сложности и организации, которые лежат в основе многих фотобиологических явлений. Приведены классификация и характеристика фотофизических и фотохимических стадий основных фотобиологических процессов.

Предназначено для студентов направления подготовки бакалавров 010700.68 «Физика» укрупненной группы 010000 «Физико-математические науки».

© Сибирский федеральный университет, 2008

Рекомендовано Инновационно-методическим управлением СФУ  
в качестве учебного пособия

Редактор Я. Н. Лысь

Разработка и оформление электронного образовательного ресурса: Центр технологий электронного обучения информационно-аналитического департамента СФУ; лаборатория по разработке мультимедийных электронных образовательных ресурсов при КрЦНИТ

Содержимое ресурса охраняется законом об авторском праве. Несанкционированное копирование и использование данного продукта запрещается. Встречающиеся названия программного обеспечения, изделий, устройств или систем могут являться зарегистрированными товарными знаками тех или иных фирм.

Подп. к использованию 10.09.2008

Объем 9 Мб

Красноярск: СФУ, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

# ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>8</b>
----------------------	----------

<b>Глава 1. ОБЩИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПОГЛОЩЕНИЯ СВЕТА БИОЛОГИЧЕСКИМИ СИСТЕМАМИ. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ФОТОБИОФИЗИКИ.....</b>	<b>9</b>
---	----------

1.1. Общая классификация электромагнитного излучения. Спектральная область фотобиологических процессов.....	11
1.2. Функционально-физиологические процессы и реакции, протекающие под действием света. Деструктивно- модификационные реакции .....	13
1.3. Общие стадии фотохимических реакций: поглощение света молекулами, электронно-возбужденные молекулярные состояния, первичная фотохимическая реакция, сопряжение фотохимических реакций с биохимическими реакциями, конечный биологический эффект.....	15
1.4. Основные характеристики электромагнитного излучения Солнца и искусственных источников света .....	17
1.5. Квантовая природа света, формула Планка, соотношение между энергией кванта, длиной волны, частотой излучения. Корпускулярно- волновой дуализм. Квантово-механическая модель энергетических состояний атомов и молекул .....	20
1.6. Поглощение света молекулой. Поглощение и пропускание монохроматического света растворами. Закон Бугера – Ламберта – Бера.....	24
1.7. Зависимость поглощения света от химического состава, концентрации и геометрических факторов молекул .....	29
1.8. Спектры поглощения и химическая структура биологически важных соединений .....	35
1.9. Формы спектров поглощения .....	39
1.10. Электронно-возбужденные состояния молекул. Схема Яблонского .....	42
1.11. Основные фотометрические величины .....	46
1.12. Спектры поглощения и спектры действия. Сечение фотохимической реакции .....	48



1.13. Искажения спектров в биологических объектах. Влияние рассеяния света на измерения .....	52
1.14. Основные оптические методы исследования биологических объектов: абсорбционная спектроскопия видимого и ультрафиолетового света, флуоресцентная спектроскопия, круговой дихроизм и дисперсия оптического вращения, ИК и Раман-спектроскопия. Качественный и количественный спектрофотометрический анализ.....	58
1.15. Аппаратура для спектрометрии в УФ-видимой области, ИК- и Раман-спектроскопии .....	72
1.15.1. Дисперсия и разрешающая способность монохроматора. ....	78
1.16. Аппаратура в люминесцентном анализе .....	81

## **Глава 2. ФОТОБИОХИМИЧЕСКИЕ И ФОТОБИОФИЗИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА ..... 85**

2.1. Химические свойства электронно-возбужденных молекулярных состояний.....	87
2.2. Квантовый выход и скорость фотохимической реакций .....	97
2.3. Основные типы фотохимических реакций.....	99
2.4. Основные законы фотохимии .....	107
2.5. Физические процессы, протекающие в возбужденных молекулах при фотохимических превращениях. Виды люминесценции.....	107
2.6. Систематика молекул по спектрально-люминесцентным свойствам .....	110
2.7. Фотолюминесценция. Фотолюминесценция биологических молекул и альтернативные пути растраты энергии возбуждения. Основные параметры люминесценции .....	116
2.8. Флуоресценция: основные характеристики и параметры .....	119
2.9. Тушение флуоресценции. Уравнение Штерна – Фольмера .....	131
2.10. Биологически важные флуоресцирующие молекулы .....	140
2.11. Природные флуорофоры.....	141
2.12. Искусственные флуорофоры .....	147
2.13. Флуоресцентные белки.....	155
2.14. Процессы, изучаемые с помощью флуоресценции .....	159

## **Глава 3. МЕХАНИЗМЫ ТРАНСФОРМАЦИИ И ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ В ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ ..... 162**



3.1. Межмолекулярный перенос энергии и электрона. Миграция энергии. Скорости дезактивации возбужденных состояний .....	162
3.2. Перенос энергии по индуктивно-резонансному механизму .....	164
3.3. Перенос энергии по обменно-резонансному механизму .....	168
3.4. Миграция экситона, полупроводниковая миграция энергии, фотопроводимость, роль ловушек .....	172
3.5. Физические методы изучения переноса энергии .....	175

## **Глава 4. ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ ..... 177**

4.1. Механизмы трансформации энергии биохимических реакций в свет. Количественные характеристики хемилюминесценции. Генерация хемилюминесценции свободными радикалами .....	177
4.2. Хемилюминесценция при перекисном окислении липидов, природа перекисных свободных радикалов .....	181
4.3. Использование хемилюминесцентных методов в биологии и медицине .....	185

## **Глава 5. БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ..... 187**

5.1. Биолюминесцентные организмы .....	188
5.2. Общий механизм биолюминесценции .....	188
5.3. Биолюминесцентная реакция светляков .....	192
5.4. Биолюминесценция кишечнорастворимых .....	198
5.5. Физико-химические механизмы биолюминесценции бактерий .....	202
5.6. Малоизученные типы биолюминесцентных реакций .....	215
5.7. Физико-химические основы биолюминесцентного анализа .....	217

## **Глава 6. БИОФИЗИКА И БИОХИМИЯ ФОТОСИНТЕЗА ..... 231**

6.1. Эволюция фотосинтеза. Фотохимические реакции в первичной атмосфере Земли .....	233
6.2. Фотосинтез на пробиотическом этапе эволюции. Зарождение гетеротрофии и автотрофии .....	236
6.3. Возникновение фотосинтеза, использующего видимый свет. Значение фотосинтеза .....	238
6.4. История открытия фотосинтеза .....	240
6.5. Фотосинтезирующие организмы .....	241
6.6. Световая и темновая фазы фотосинтеза .....	244

6.7. Основные классы фотосинтетических пигментов .....	246
6.8. Строение фотосинтетического аппарата .....	250
6.9. Типы фотосистем .....	251
6.10. Общая схема фотосинтетического потока электронов .....	252
6.11. Функциональные взаимодействия компонентов фотосинтетического аппарата .....	256
6.12. Механизм фотофосфорилирования .....	260
6.13. Строение АТФ-синтазы .....	262
6.14. Механизм работы АТФ-синтазы .....	263
6.15. Циклическое фотофосфорилирование .....	264
6.16. Синтез углеводов в фотосинтезирующих организмах. Цикл Кальвина .....	266
6.17. Организация фотосинтетического аппарата бактерий .....	274
6.18. Регуляция световых и темновых стадий фотосинтеза .....	278
6.19. Использование люминесценции фотосинтетических пигментов в экологии .....	286

## **Глава 7. ДРУГИЕ ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ЯВЛЕНИЯ: ФОТОРЕЦЕПЦИЯ И ЗРЕНИЕ, ФОТОТРОПИЗМ И ФОТОТАКСИС, ФОТОМУТАГЕНЕЗ И ФОТОРЕПАРАЦИЯ ДНК. ПЕРСПЕКТИВЫ СОВРЕМЕННОЙ ФОТОБИОФИЗИКИ..... 297**

7.1. Фоторецепция у различных видов организмов. Зрение .....	298
7.2. Основные типы фоторегуляторных, физиологических и биохимических реакций у растительных и микробных организмов .....	318
7.3. Повреждающее действие света на человека, животных и другие организмы .....	335
7.4. Механизмы рецепции света у высших растений .....	356
7.5. Фотохимические реакции в нуклеиновых кислотах, белках и липидах .....	372
7.6. Фотореактивация ДНК и фотодинамическая терапия .....	393
7.7. Перспективы исследования роли электронно-возбужденных состояний в жизнедеятельности живых организмов .....	408
7.8. Основные проблемы и нерешенные задачи в фотобиофизике, возможные пути их прояснения .....	409

<b>ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....</b>	<b>416</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....</b>	<b>417</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ 3.....</b>	<b>418</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ 4.....</b>	<b>421</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ 5.....</b>	<b>422</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ 6.....</b>	<b>425</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>426</b>
<b>ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ .....</b>	<b>427</b>
<b>БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК .....</b>	<b>434</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Биосфера с ее многообразием живых организмов функционирует благодаря поступлению световой солнечной энергии на поверхность Земли. При прекращении поступления этой энергии жизнь на планете быстро исчезнет. Свет играет исключительную роль для ориентации и получения жизненно важной информации у животных. Благодаря свету в живых организмах протекает целый ряд биофизических и биохимических процессов, не связанных напрямую с клеточными энергетическими процессами. Вместе с тем свет ультрафиолетового диапазона является мощной разрушительной силой для всего живого. Поэтому важным разделом биофизики является фотобиофизика (или биофизика фотобиологических процессов) – наука, изучающая закономерности и механизмы действия света на биологические системы и его использования ими. Предмет фотобиофизики составляют такие, на первый взгляд, разноплановые явления, как фотосинтез, зрение, биолюминесценция, канцерогенез и др. Известно, что действие света в одних случаях является необходимым фактором для протекания многих биологических процессов, в других – губительным. Широкое использование световой энергии во многих технологических процессах, в медицине и народном хозяйстве делает изучение действия света на живые системы весьма актуальным.

Изучение механизмов фотобиологических процессов служит теоретическим фундаментом повышения продуктивности фотосинтеза сельскохозяйственных растений, искусственного культивирования растений, интенсификации развития сельскохозяйственных животных, использования излучений в медицинской практике и в борьбе с загрязнением окружающей среды. Исследования в области фотобиофизики тесно связаны с проблемой биологического использования солнечной энергии и созданием искусственных систем на основе принципов фотобиологических явлений.

В предлагаемом пособии изложены основные закономерности и механизмы действия света на биологические системы различной сложности и организации, поскольку они лежат в основе многих фотобиологических явлений, дается классификация и характеристика фотофизических и фотохимических стадий основных фотобиологических процессов, информация о научной аппаратуре для постановки экспериментов по изучению действия света на биосистемы. Информация в пособии изложена с учетом современного состояния научных знаний, уровня развития сложного оборудования, методологических подходов, существующих в науке в настоящий момент. Изучение данного курса позволит увидеть общность физико-химических механизмов фотобиологических процессов, что поможет в формировании целостного естественно-научного мировоззрения.

# **ГЛАВА 1. ОБЩИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПОГЛОЩЕНИЯ СВЕТА БИОЛОГИЧЕСКИМИ СИСТЕМАМИ. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ФОТОБИОФИЗИКИ**

## **П л а н   г л а в ы**

1.1.Общая классификация электромагнитного излучения. Спектральная область фотобиологических процессов.

1.2.Функционально-физиологические процессы и реакции, протекающие под действием света. Деструктивно-модификационные реакции.

1.3.Общие стадии фотохимических реакций: поглощение света молекулами, электронно-возбужденные молекулярные состояния, первичная фотохимическая реакция, сопряжение фотохимических реакций с биохимическими реакциями, конечный биологический эффект.

1.4.Основные характеристики электромагнитного излучения Солнца и искусственных источников света.

1.5.Квантовая природа света, формула Планка, соотношение между энергией кванта, длиной волны, частотой излучения. Корпускулярно-волновой дуализм. Квантово-механическая модель энергетических состояний атомов и молекул.

1.6.Поглощение света молекулой. Поглощение и пропускание монохроматического света растворами. Закон Бугера – Ламберта – Бера.

1.7.Зависимость поглощения света от химического состава, концентрации и геометрических факторов молекул.

1.8.Спектры поглощения и химическая структура биологически важных соединений.

1.9.Формы спектров поглощения.

1.10.Электронно-возбужденные состояния молекул. Схема Яблонского.

1.11.Основные фотометрические величины.



1.12.Спектры поглощения и спектры действия. Сечение фотохимической реакции.

1.13.Искажения спектров в биологических объектах. Влияние рассеяния света на измерения.

1.14.Основные оптические методы исследования биологических объектов: абсорбционная спектроскопия видимого и ультрафиолетового света, флуоресцентная спектроскопия, круговой дихроизм и дисперсия оптического вращения, ИК- и Раман-спектроскопия. Качественный и количественный спектрофотометрический анализ.

1.14.1.Методы атомной спектроскопии.

1.14.2.УФ-видимая спектроскопия.

1.14.3.ИК- и Раман-спектроскопия.

1.14.4.Флуоресцентная спектроскопия.

1.14.5.Круговой дихроизм и дисперсия оптического вращения.

1.15.Аппаратура для спектрометрии в УФ-видимой области, ИК- и Раман-спектроскопии.

1.15.1.Дисперсия и разрешающая способность монохроматора.

1.16.Аппаратура в люминесцентном анализе.

## 1.1. Общая классификация электромагнитного излучения. Спектральная область фотобиологических процессов

Влияние света на рост, развитие и многообразные функции организмов известно с древнейших времён. Биосфера нашей планеты с ее многообразием живых организмов сформировалась (да и зародилась) под действием солнечного излучения. Фактически именно солнечный свет является единственным источником энергии почти для всех форм жизни на Земле (не считая атомную энергию, используемую человеком). Электромагнитное излучение представляет собой вид энергии, которая распространяется в вакууме со скоростью около 300 000 км/с и которая может выступать в форме света, теплового и ультрафиолетового излучения, микро- и радиоволн, гамма- и рентгеновских лучей. Одни свойства электромагнитного излучения удобнее описывать, исходя из его волновой природы, другие – из корпускулярной. Характеристиками электромагнитного излучения с волновой точки зрения (как классической синусоидальной волны) являются длина волны, частота, амплитуда и скорость распространения. Для распространения электромагнитного излучения не требуется наличия какой-либо вещественной среды (как, например, для звуковых волн): оно может распространяться и в вакууме. В зависимости от длины волны выделяют 6 диапазонов электромагнитных волн ([табл. 1.1](#)).

Таблица 1.1

Шкала электромагнитных волн

№ п/п	Диапазон	Длина волны, $\lambda$	Энергия, эВ
1	Гамма-излучение	$<0,012 \text{ \AA}$	$>10^6$
2	Рентгеновское	$(0,012-120) \text{ \AA}$	$100-10^6$
3	Ультрафиолетовое	$120 \text{ \AA} - 380 \text{ нм}$	$3,2-100$
4	Видимое излучение	$380-760 \text{ нм}$	$1,6-3,2$
5	Инфракрасное излучение	$760 \text{ нм} - 1 \text{ мм}$	$1,2 \cdot 10^{-3}-1,6$
6	Радиоволны	$>1 \text{ мм}$	$<1,2 \cdot 10^{-3}$

Ультрафиолетовое, видимое и инфракрасное излучение образуют оптическую область спектра – электромагнитные волны с  $10 \text{ нм} < \lambda < 2 \text{ мм}$ . Он ограничен с одной стороны рентгеновскими лучами, а с другой – микроволновым диапазоном радиоизлучения ([рис. 1.1](#)).



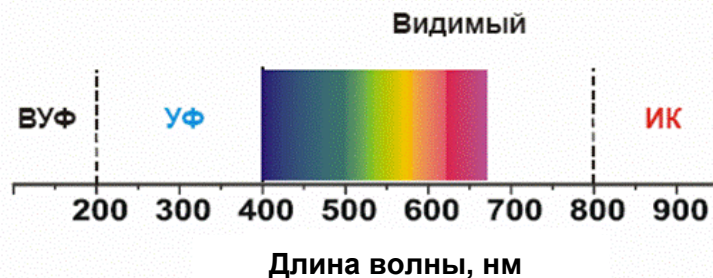


Рис. 1.1. Оптическая область спектра

Источником *инфракрасного излучения* являются нагретые тела. Они излучают сплошной спектр, максимум излучения которого зависит от температуры тела. Обычно это лампы накаливания с вольфрамовой спиралью, температура которой в нагретом состоянии составляет 2200 К. Максимум излучения тел, имеющих комнатную температуру (20°C), расположен в далекой ИК-области ~ 10 000 нм. Для измерения ИК-излучения используют термосопротивления и фотоэлектрические приборы.

*Волны ультрафиолетового диапазона* создаются нагретыми до высокой температуры твердыми телами, а также газоразрядными источниками, среди которых наиболее распространены ртутные, водородные и дейтериевые лампы. Регистрацию УФ-излучения осуществляют в основном фотографическим и фотоэлектрическим методом.

*Рентгеновское излучение* возникает в результате торможения быстрых электронов при их соударении с поверхностью твердых тел (тормозное рентгеновское излучение), а также при вырывании электронов из внутренних оболочек атомов (характеристическое рентгеновское излучение).  $\gamma$ -излучение возникает в результате ядерных реакций.

Фотобиофизика связана практически со всеми сторонами жизнедеятельности растений и животных. Поэтому важным разделом биофизики является фотобиофизика – наука, изучающая закономерности и механизмы действия света на биологические системы. Строго говоря, [фотобиофизика](#) изучает фотобиологические процессы, протекающие в организмах под действием видимого, ультрафиолетового и ближнего инфракрасного излучений.

Начало фотобиологии было положено в XVIII–XIX вв. открытием фотосинтеза (английский химик Дж. Пристли, голландский учёный Я. Ингенхауз, швейцарский исследователь Ж. Сенебье), а также разработкой основ теории цветового зрения (немецкий физик, математик, физиолог и психолог Г. Гельмгольц). Самостоятельное научное направление фотобиофизики сформировалось лишь во 2-й половине XX в. благодаря развитию квантовой теории излучения, которая и стала физической основой фотобиофизики, основой внедрения новых методов фотобиофизических исследований: дифференциальной и импульсной спектрофотометрии,

измерения люминесценции, методов, основанных на электронном парамагнитном резонансе и т. д.

## 1.2. Функционально-физиологические процессы и реакции, протекающие под действием света.

### Деструктивно-модификационные реакции

Фотофизическими процессами можно назвать все процессы взаимодействия света с веществом: фотовозбуждение, испускание, фотодиссоциация, фотоионизация, перенос энергии возбуждения от донора к акцептору, тушение и некоторые другие.

Широкий спектр фотобиологических процессов: фотосинтез – синтез органических молекул за счет энергии солнечного света; фототаксис – движение организмов, например бактерий, к свету или от света; фототропизм – поворот листьев или стеблей растений к свету или от света; зрение – превращение световой энергии в энергию нервного импульса в сетчатке глаза или в аналогичных фоторецепторах; действие ультрафиолетовых лучей (бактерицидное или бактериостатическое действие на микроорганизмы, мутагенное действие, канцерогенное действие, образование витамина D из провитаминов, эритемное действие на кожу, образование загара, терапевтические эффекты); биохемилюминесценция (сверхслабые свечения, биолюминесценция), т. е. определенные биохимические реакции сопровождаются появлением электронно-возбужденного продукта с последующим испусканием кванта света (люминесценции) и др. Огромное число фотобиологических реакций подразделяют на два типа: функционально-физиологические и деструктивно-модифицирующие реакции (рис. 1.2).

Фотобиологические реакции – реакции, возникающие в биологических системах различной сложности под действием света. Различают фотобиологические реакции, протекающие с поглощением кванта света ( $h\nu$ ), например, фотосинтез (растений, бактерий, водорослей), фоторецепторные реакции, зрение и др.; а также фотобиологические реакции, протекающие с испусканием кванта света ( $h\nu$ ), к ним относятся биолюминесценция и хемилюминесценция. Каждый тип реакций подразделяется на три класса. Характеристики разных классов фотобиологических реакций приведены в табл. 1.2.

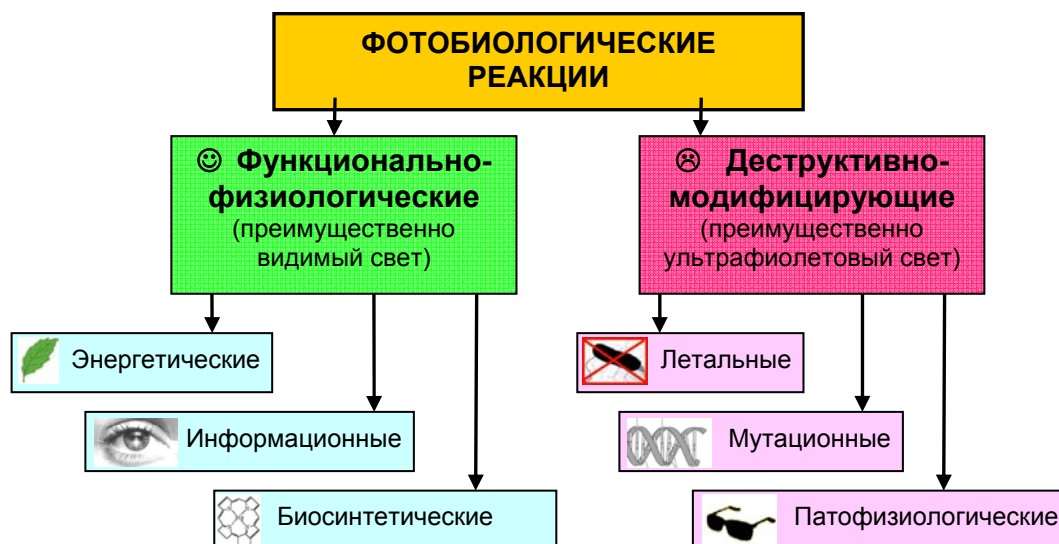


Рис. 1.2. Фотобиологические реакции

Таблица 1.2  
Основные характеристики фотобиологических реакций

№	Класс реакции	Что происходит в организме?	Примеры
<i>Функционально-физиологические реакции</i>			
1	Энергетические	Синтез новых органических молекул со свободной энергией, большей, чем у исходных реагентов. Таким образом, происходит запасание энергии	Фотосинтез
2	Информационные	Образуются фотопродукты, запускающие специализированные усилительные механизмы, в результате чего организм получает информацию о ситуации в окружающей среде	Зрение, фототаксис, фототропизм
3	Биосинтетические	В организмах существуют сложные цепочки последовательных этапов синтеза органических молекул, в которых есть запускаемые светом стадии	Биосинтез хлорофилла, витамина D
<i>Деструктивно-модифицирующие реакции</i>			
4	Летальные	Повреждаются биологически важные молекулы (прежде всего ДНК), что приводит к гибели организма. Характерно для вирусов, микроорганизмов, простейших	Бактериостатический и бактерицидный эффекты
5	Мутационные	Замена или выпадение основания в ДНК, т. е. возникновение мутации. Организм при этом не гибнет	Фотодинамический эффект
6	Патофизиологические	Временное нарушение метаболизма и физиологического состояния клеток и организмов. Не происходит повреждения критически важных структур	Эритема, канцерогенез

Фотобиологические реакции проходят в несколько стадий, большинство этих реакций начинаются с поглощения кванта света биологическими молекулами, а завершаются неким биологическим эффектом. Примером биологического эффекта может служить такое хорошо известное явление, как загар кожи. Упрощенно можно сказать, что в первом случае свет приносит некоторую пользу организму, которым был поглощен,

а во втором случае – вред. Если с помощью света запускаются реакции, в которых образуются продукты, необходимые для выполнения естественных функций клеток или организмов, то они относятся к функционально-физиологическим фотобиологическим реакциям. Если же под действием света происходит повреждение биологических молекул, что приводит к химическим реакциям, не свойственным организму в норме, то такие реакции относятся к деструктивно-модифицирующим.

Следует обратить внимание, что деструктивно-модифицирующие реакции вызываются, главным образом, ультрафиолетовым светом, а функционально-физиологические – светом видимого диапазона.

### 1.3. Общие стадии фотохимических реакций: поглощение света молекулами, электронно-возбужденные молекулярные состояния, первичная фотохимическая реакция, сопряжение фотохимических реакций с биохимическими реакциями, конечный биологический эффект

Фотобиологические реакции очень разнообразны, но все они характеризуются сходной последовательностью стадий, которые схематично представлены на [рис. 1.3](#).

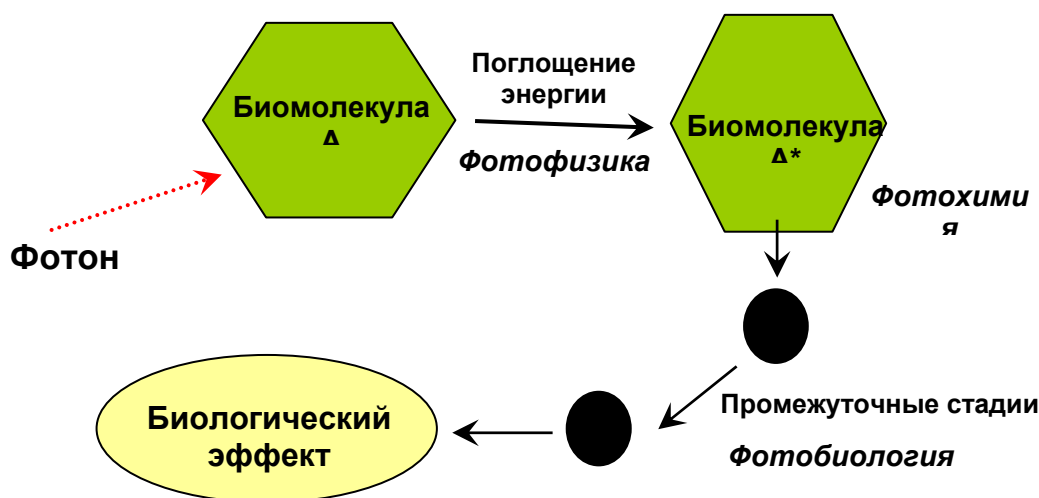


Рис. 1.3. Общая схема фотобиофизического процесса

Явления, протекающие на первых, биофизических, стадиях: поглощение света; перераспределение энергии в молекуле, находящейся в электронном возбужденном состоянии; межмолекулярный перенос энергии, образование первичных фотопродуктов и превращение их в первые химически устойчивые соединения, – оказываются общими для всех фотобиологических процессов. Именно это позволяет рассматривать первичные стадии фотобиологических процессов с единой точки зрения.

Первая стадия – фотофизическая – заключается в поглощении света биологически активным хроморофом, т. е. молекулой, от которой начинается

вся цепочка событий, приводящих к конечному эффекту на уровне целого организма. Хромофорами называют молекулы, способные поглощать свет из определенного диапазона длин волн. Благодаря этому их свойству мы воспринимаем вещества, содержащие хромофоры, как цветные. Например, лист растения мы видим зеленым, потому что он содержит хлорофиллы, которые поглощают синий и красный свет и пропускают зеленый. А морковь оранжевая, потому что в ней содержится большое количество каротиноидов. Хромофоры живых организмов, поглощающие в видимом диапазоне, называют также пигментами.

После взаимодействия со светом хромофорная молекула переходит в возбужденное состояние, что может дать начало фотобиологическому процессу.

*Вторая стадия* – первичная фотохимия. В ходе этой стадии образуется первичный фотопродукт, непосредственно участвующий в дальнейших химических или физико-химических превращениях.

*Третья стадия* – вторичная фотохимия. В результате этой стадии после спонтанных химических превращений первичного фотопродукта образуется стабильный продукт. Стабильное соединение отличается устойчивостью в течение достаточно длительных промежутков времени.

Вторая и третья стадии любой фотобиологической реакции состоят из одной или нескольких фотохимических реакций. Фотохимические реакции отличаются от просто химических тем, что происходят с молекулами в возбужденном состоянии (а не в основном).

*Четвертая стадия* – темновые превращения, включающие в себя цепь биохимических реакций или перестроек клеточных структур (чаще всего мембран).

*Пятая стадия* – конечный биологический эффект. Результат биохимических или структурных изменений проявляется на уровне организма: происходит синтез богатых энергией веществ, движение биообъекта, модификация генотипа и т. п.

Простейшие примеры первичных фотохимических реакций и конечных биологических эффектов приведены на рис. 1.4 и рис. 1.5.



а



б

Рис. 1.4. Фотобиологическая реакция загара кожи:

а – первая стадия – поглощение света кожей;

б – последняя стадия – биологический эффект (потемнение кожи – загар)





Рис. 1.5. Фототропизм – изгиб стебля растения в сторону света:  
 а – первая стадия – поглощение света;  
 б – последняя стадия – биологический эффект (изгиб стебля)

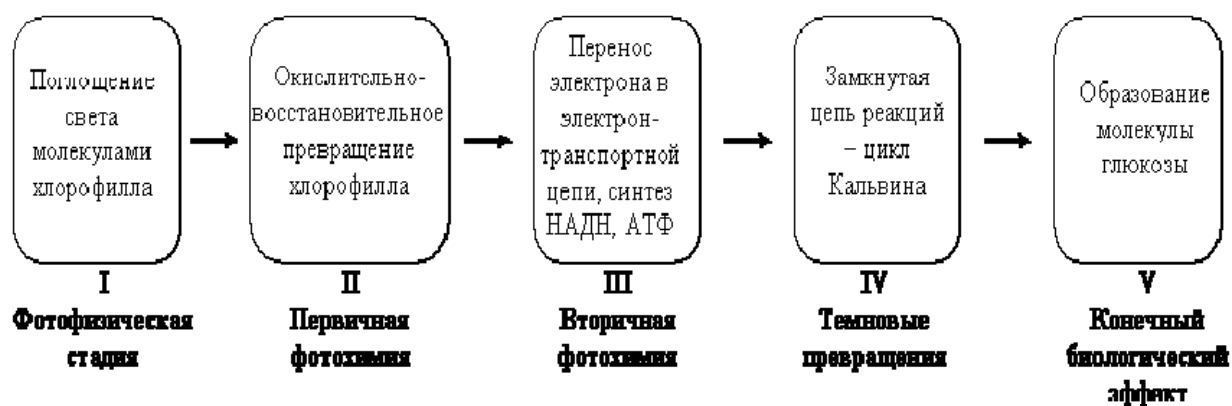


Рис. 1.6. Последовательность основных стадий фотобиологической реакции на примере фотосинтеза

Рассмотрим основные стадии фотобиологической реакции на примере фотосинтеза (рис. 1.6).

Изучение начальных стадий фотобиологических процессов, которые заканчиваются образованием первых устойчивых химических соединений, можно считать областью биофизики. Дальнейшие процессы происходят по биохимическим и физиологическим законам.

## 1.4. Основные характеристики электромагнитного излучения Солнца и искусственных источников света

В ходе эволюции выработались приспособления для полезного использования световой энергии Солнца, которая является важнейшим экологическим фактором. Какие-либо изменения спектрального состава света и светового режима могут вызвать необратимые процессы в биосфере, в том числе и резкое усиление вредных эффектов ультрафиолетового излучения. Солнце представляет собой сильно нагретое тело с температурой

поверхности около 6000K. Максимум его излучения приходится примерно на 500нм. При прохождении через атмосферу Земли спектр излучения Солнца значительно изменяется в результате рассеяния и поглощения света молекулами и частицами атмосферы: в его спектре практически полностью исчезает ультрафиолетовое излучение короче 300нм. Интенсивность падающего на Землю солнечного излучения в зависимости от длины волны представлена на [рис. 1.7](#). Рядом с кривыми указаны молекулы, поглощение которых приводит к появлению провалов в спектре. Спектр солнечного света и спектры поглощения кислорода и озона представлены на [рис. 1.8](#).

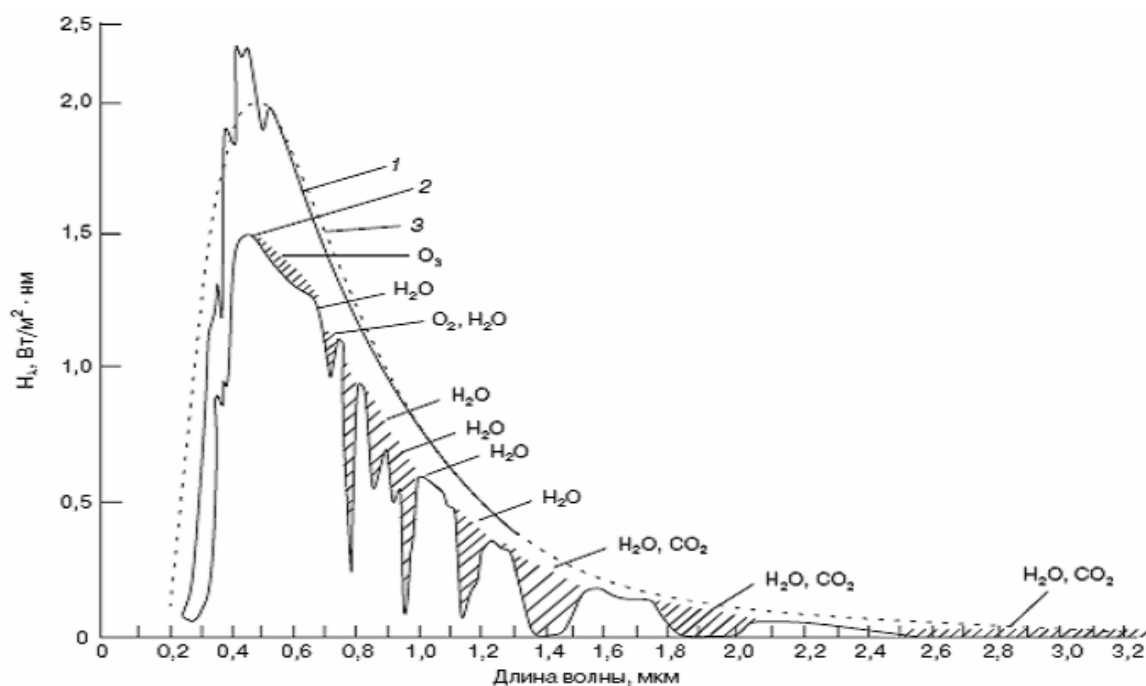


Рис. 1.7. Интенсивность падающего на Землю солнечного излучения в зависимости от длины волны

Уникальность электромагнитных волн оптического диапазона заключается в том, что он является главным источником информации для человека. У поверхности Земли основная энергия излучения Солнца сосредоточена на длине волны вблизи 500 нм. В результате длительной эволюции у человека и многих животных появилась способность воспринимать электромагнитные волны именно диапазона 380–760 нм.



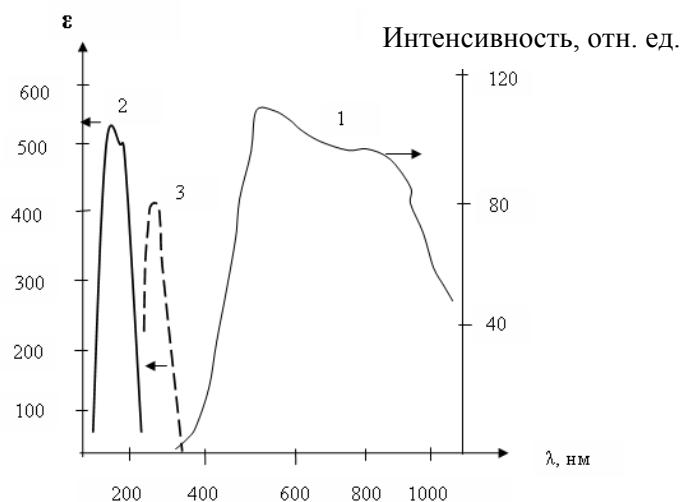


Рис. 1.8. Спектр солнечного света и спектры поглощения кислорода и озона:  
1 – излучение Солнца у поверхности Земли; 2 – кислород; 3 – озон

Вообще все тела, имеющие температуру выше 0К, излучают электромагнитные волны. Это явление носит название «тепловое излучение» и подчиняется законам теплового излучения: закон Стефана – Больцмана, закон смещения Вина (рис. 1.9) и др. При обычных температурах предметы, которые окружают нас, излучают в далекой инфракрасной области.

Относительное число фотонов

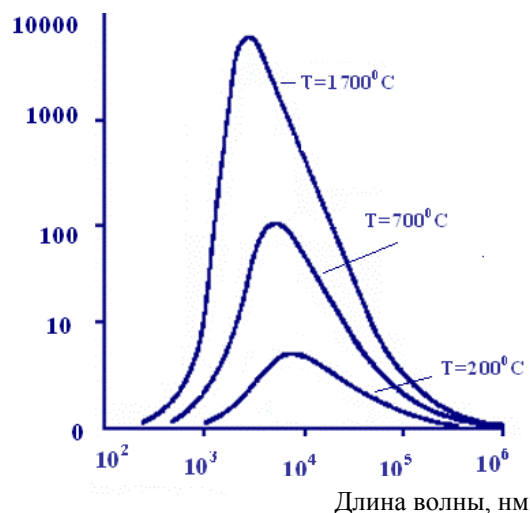


Рис. 1.9. Закон смещения Вина

К искусственным источникам света относятся, прежде всего, широко используемые в обычной жизни лампы накаливания. Это лампы накаливания с вольфрамовой спиралью, температура которой в нагретом состоянии составляет 2200 К. Они излучают сплошной спектр, максимум излучения которого зависит от температуры тела. Максимум излучения таких тел, имеющих комнатную температуру (20°C), расположен в далекой ИК-области ~10 000 нм. Для измерения ИК-излучения используют термосопротивления и фотоэлектрические приборы.

Электромагнитные волны видимого диапазона создаются нагретыми твердыми телами, газоразрядными источниками, телами при воздействии на них внешнего излучения, других факторов (сюда относятся, прежде всего, различные виды люминесценции). Основным источником видимого света является Солнце.

Ультрафиолетовый диапазон волн создается нагретыми до высокой температуры твердыми телами, газоразрядными источниками (ртутные, водородные и дейтериевые лампы). Регистрация УФ-излучения осуществляется фотографическим, фотоэлектрическим методом.

### **1.5. Квантовая природа света, формула Планка, соотношение между энергией кванта, длиной волны, частотой излучения. Корпускулярно-волновой дуализм. Квантово-механическая модель энергетических состояний атомов и молекул**

В результате развития представлений о природе света выяснился его двойственный характер (дуализм). Одни явления могут быть объяснены предположением о том, что свет представляет собой поток частиц – фотонов (фотоэффект, эффект Комптона). Другие – предположением, согласно которому свет является волной (интерференция, дифракция).

В 1924 году Луи де Бройль, предполагая наличие в природе симметрии, выдвинул гипотезу, что дуализм не является особенностью одного света, что он свойственен всей материи (электронам и любым другим частицам). Согласно де Бройлю с каждой микрочастицей связывается, с одной стороны, корпускулярные характеристики – энергия  $E$  и импульс  $p$ , а с другой стороны, волновые характеристики – частота  $\omega$  и волновой вектор  $k$  ( $k = 2\pi/\lambda$ ). Количественные соотношения, связывающие корпускулярные и волновые характеристики, принимаются для частиц такими же, как для фотонов:

$$E = \hbar\omega, \quad p = \hbar k$$

Гипотеза де Бройля вскоре была подтверждена экспериментально. Экспериментальное подтверждение идеи де Бройля об универсальности корпускулярно-волнового дуализма стимулировало развитие квантовой теории, что привело к созданию законченной теории. Длина волны, волновые числа и энергия фотона, а также соотношение между различными единицами измерения этих величин приведены в [прил. 1](#).

Основой современной теории строения атома является квантово-механическое описание атома, предложенное Шредингером. Его сущность заключается в том, что движение микрообъекта описывается волновым уравнением, а определение местоположения объекта производится по вероятностным принципам. Шредингер применил уравнение волнового

движения к движению электрона в атоме. При этом энергия электрона оказалась зависимой только от некоторой волновой функции  $\psi$ . В самом общем виде уравнение Шредингера можно записать как

$$-\frac{h}{2\pi^2 m} \left( \frac{\partial^2 \psi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \psi}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \psi}{\partial z^2} \right) + U\psi = E\psi,$$

где  $U$  – потенциальная энергия электрона;  $E$  – полная энергия электрона;  $\psi$  – волновая функция, характеризующая движение электрона.

Первая особенность уравнения Шредингера состоит в том, что оно имеет решение только при некоторых определенных значениях энергии электрона  $E$  и не имеет решения при промежуточных значениях, т. е. поведение электрона в атоме имеет дискретный (квантовый) характер. Вторая особенность заключается в том, что его решения показывают вероятность нахождения электрона в той или иной точке пространства вокруг ядра атома и никак не связывают эту вероятность с траекторией движения электрона. Третья особенность – сложность его решения для многоэлектронных систем.

На [рис. 1.10](#) показан вид волновых функций для состояния с наименьшей энергией атома водорода. Сама волновая функция имеет ограниченный физический смысл, зато ее квадрат  $\psi^2$  является мерой вероятности нахождения электрона в некотором объеме на расстоянии  $r$  от ядра. Наиболее важное значение имеет вид функции  $\psi^2$ . Она определяет вероятность нахождения электрона в некотором пространстве.

Пространственное расположение волновых функций электрона приведено в [прил. 2](#). Поверхности (так называемые пограничные поверхности) проведены так, что внутри них электрон находится большую часть времени (90%). Таким образом, вместо боровских орбит, подобно орбитам планет, квантовая механика ввела понятие пространства, в котором электрон находится большую часть времени. Эти пространства получили название орбиталей. Интерпретация орбиталей состоит в следующем. Электрон часто бывает удобно рассматривать как бы размазанным в пространстве орбитали в виде электронного облака, поэтому величина  $\psi^2$  служит также и мерой электронной плотности в данном объеме. В этом смысле под орбиталью можно понимать пространство, заключающее около 90% электронного облака.

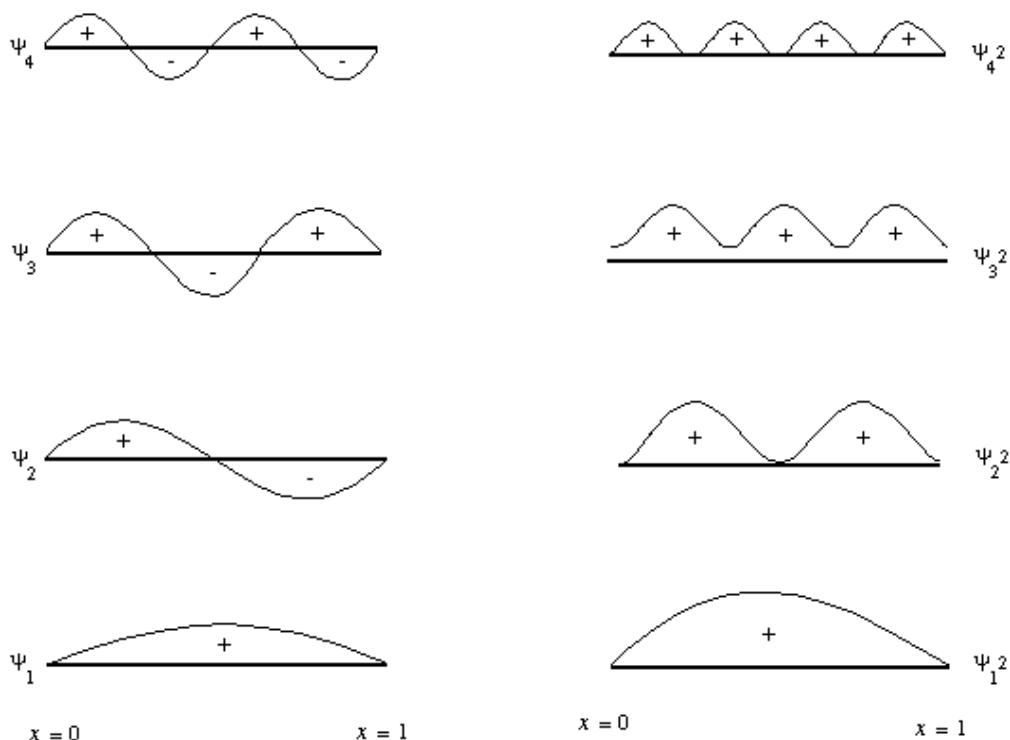


Рис. 1.10. Волновые функции электрона в атоме водорода для состояний с наименьшей энергией

Чрезвычайно важной характеристикой орбитали является вид ее симметрии. Орбитали, имеющие шаровую симметрию, носят название *s*-орбиталей. Орбитали, имеющие вид гантелей, называются *p*-орбиталями. Более сложный вид имеют *d*- и *f*-орбитали. Из решения уравнения Шредингера следует, что в электронном уровне может быть одна *s*-орбиталь, три *p*-орбитали, пять *d*- и семь *f*-орбиталей. Оси трех *p*-орбиталей расположены под углом  $90^\circ$  друг к другу. Расположение пяти *d*-орбиталей показано в [прил. 2](#).

Дискретные квантовые состояния электрона в атоме проявляются в различии форм орбиталей и отсутствии промежуточных между ними форм, в определенном расположении орбиталей в пространстве, когда некоторые направления предпочтительно заполняются электронами, а другие – пустуют. Существует *система квантовых характеристик электрона* (обозначаемых формально квантовыми числами), которая определяет, какие характеристики движения изменяются скачкообразно ([прил. 3](#)).

Для полного описания электрона в атоме, таким образом, необходимо наряду с главным орбитальным и магнитным квантовыми числами задавать еще магнитное спиновое квантовое число. Состояние электрона в атоме определяется набором четырех квантовых чисел:

- главного  $n$  ( $n = 1, 2, 3, \dots$ ),
- орбитального  $l$  ( $l = 0, 1, 2, \dots, n - 1$ ),
- магнитного ( $m_l = -l, \dots, 0, \dots, +l$ ),

магнитного спинового ( $m_s = \pm 1/2$ ).

Напомним также, что релятивистская квантовая механика устанавливает, что симметрия или антисимметрия волновых функций определяется спином частиц. Частицы с полуцелым спином (электроны, протоны, нейтроны) описываются антисимметричными волновыми функциями. Такие частицы называют фермионами и подчиняются статистике Ферми – Дирака. Частицы с нулевым или целочисленным спином (например фотоны) описываются симметричными волновыми функциями. Эти частицы называют бозонами и подчиняются статистике Бозе – Эйнштейна. Сложные частицы (например атомные ядра), состоящие из нечетного числа фермионов, являются фермионами (суммарный спин – полуцелый), а из четного – бозонами (суммарный спин целый).

Заполнение электронных оболочек атомов описывается принципом Паули и правилом Хунда.

Принцип Паули: в атоме не может быть двух электронов в состояниях, характеризующихся четырьмя одинаковыми квантовыми числами.

Правило Хунда: в пределах подуровня электроны заполняют максимальное количество орбиталей.

*Характерные оптические свойства* атомов элементов Периодической системы Менделеева определяются, главным образом, валентными электронами, расположенными на внешних орбиталях. Линии в спектрах поглощения и испускания элемента связаны в основном с электронными переходами  $s-p$ ,  $s-d$ ,  $d-p$ ,  $d-f$  и т. д. Элементы, стоящие в одной группе Периодической системы, имеют подобные электронные конфигурации (совокупности атомных орбиталей различного пространственного строения) и сходные спектры. Наблюдается самая непосредственная связь между энергией электронных уровней (определяемой главным квантовым числом  $n$ ), орбитальной природой (орбитальное квантовое число  $l$ ) и мультиплетностью (спиновое квантовое число  $s$ ), с одной стороны, и оптическими свойствами атомов, связанными с определенными правилами отбора, с другой. Таким образом, периодичность физико-химических, в том числе и оптических, свойств атомов обусловлена распределением электронов по орбиталям или по энергетическим уровням этих орбиталей, которым можно приписывать соответствующие значения квантовых чисел  $n$ ,  $l$ ,  $m$ ,  $s$ . Аналогично атомам электронные переходы молекул можно также классифицировать по орбитальному признаку.

Далее рассмотрим природу связи в молекулах. Различают два вида связи между атомами в молекуле: ионную и ковалентную связи.

*Ионная связь*. Если два нейтральных атома постепенно сближать друг с другом, то в случае ионной связи наступает момент, когда внешний электрон одного из атомов предпочитает присоединиться к другому атому. Атом, потерявший электрон, ведет себя как частица с положительным зарядом  $+e$ , а атом, приобретший лишний электрон, – как частица с отрицательным

зарядом  $-e$ . Примером молекулы с ионной связью может служить  $\text{HCl}$ ,  $\text{LiF}$  и др.

*Ковалентная связь.* Другим распространенным типом молекулярной связи является ковалентная связь (например, в молекулах  $\text{H}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}$ ). В образовании ковалентной связи участвуют два валентных электрона соседних атома с противоположно направленными спинами. В результате специфического квантового движения электронов между атомами образуется электронное облако, которое обуславливает притяжение атомов.

Молекулярные спектры сложнее атомных спектров, так как кроме движения электронов относительно ядер в молекуле происходят колебательные движения ядер (вместе с окружающими их внутренними электронами) около положений равновесия и вращательные движения молекул.

Квантово-механическое рассмотрение молекул позволяет выделить 5 типов орбиталей –  $\sigma$ ,  $\pi$ ,  $n$ ,  $l$ ,  $\nu$  – и положить их в основу классификации молекул.

Уровни энергии орбиталей определяются порядковым номером элемента, главным квантовым числом, а также гибридизацией орбиталей. Обычно в соответствии со своим положением  $l$ -орбитали, главным образом, принимают участие в формировании основного состояния ( $\pi l$ ) (такая запись означает смешивание  $\pi$ - и  $l$ -орбиталей), а  $\nu$ -орбитали – возбужденного состояния ( $\nu \pi^*$ ) (эта запись означает смешивание  $\nu$ - и возбужденной  $\pi^*$ -орбитали). Электронную структуру молекулы можно характеризовать совокупностью уровней энергии молекулярных и атомных орбиталей, их природой и относительным положением.

## 1.6. Поглощение света молекулой.

### Поглощение и пропускание монохроматического света растворами. Закон Бугера – Ламберта – Бера

При распространении электромагнитных волн и, в частности, световых в любой среде наблюдается более или менее значительное уменьшение их интенсивности из-за взаимодействия электрического и магнитного полей волны с атомами и молекулами среды: рассеяние, люминесценция, фотохимическое разложение вещества и др. Если прохождение света через некоторую среду свет не вызывает необратимых изменений, т. е. не происходят фотохимические реакции, и вещество достаточно однородно, так что можно пренебречь рассеянием, то изменение интенсивности света обусловлено превращением энергии электромагнитного поля волны в другие виды энергии (чаще всего в энергию хаотического теплового движения атомов и молекул вещества) и называется поглощением света.

Интенсивность излучения ( $I$ ) – модуль среднего по времени значения плотности потока энергии. Плотность потока энергии ( $J$ ) – поток энергии



( $\Phi$ ) через единичную площадку, расположенную перпендикулярно к направлению, в котором переносится энергия:

$$J = \frac{\Phi}{\Delta t \Delta S_{\perp}},$$

$J$  – вектор Умова – Пойтинга, который, как известно из курса общей физики, можно найти как произведение плотности энергии ( $\omega$ ) на скорость волны ( $v$ ):  $J = \omega v$ .

Законы поглощения света основываются на общих положениях молекулярной оптики и квантовой механики. Возникновение электронных представлений дало возможность детально изучить взаимодействие световой волны и вещества. Это взаимодействие сводится к возбуждению колебаний электронов, входящих в состав атомов и молекул: со стороны электромагнитного поля на электрон будет действовать переменная сила, которая заставит его совершать колебательное движение.

Основной закон поглощения света в однородном материале может быть выведен независимо от модельных представлений о деталях взаимодействия света с веществом на основе энергетических соображений: пусть параллельный пучок монохроматического излучения с частотой  $\nu$  и начальной интенсивностью  $I_0$  нормально падает на плоский слой изотропного однородного вещества толщиной  $l$  (рис. 1.11). Начальная и конечная интенсивности должны быть измерены с учетом отражения света от границ слоя вещества. Так как величина отраженной части энергии не зависит от толщины слоя, то при достаточно толстых слоях отражением можно пренебречь по сравнению с поглощением излучения.

Будем считать, что молекулы хромофоров распределены в растворе равномерно, а падающий на образец свет является монохроматическим. В растворе под действием измеряющего света не протекают фотохимические превращения хромофоров. Интенсивность светового пучка, падающего на исследуемый образец, не слишком высока, что исключает возможность нескольким фотонам попадать на молекулу за время жизни ее возбужденного состояния. Если в образце происходит поглощение света, то в результате интенсивность света уменьшится до величины  $I_l$ . Отношение этих величин называют *пропусканием*  $T$ :

$$T = \frac{I}{I_0}.$$



Поглощением называется величина

$$1 - T = \frac{I_0 - I}{I_0} = \frac{I_{\text{п}}}{I},$$

где  $I_{\text{п}}$  – количество света, поглощаемого в единицу времени.

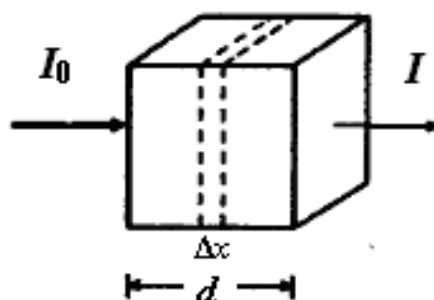


Рис. 1.11. Изменение интенсивности параллельного пучка света в плоском слое изотропного однородного вещества

Увеличение концентрации поглощающего вещества или толщины кюветы с раствором приводит к увеличению поглощения света, т. е. величины  $(1 - T)$ , и уменьшению пропускания образца  $T$ , которые не пропорциональны ни концентрации раствора, ни толщине кюветы и поэтому не слишком удобны для количественного описания поглощения растворов.

Логарифм величины, обратной коэффициенту пропускания, называется оптической плотностью  $D$ :

$$D = \lg \frac{I_0}{I} = \lg \frac{1}{T}.$$

И коэффициент пропускания и оптическая плотность есть величины безразмерные. Найдем зависимость  $T$  от концентрации и толщины раствора. Разделим весь слой вещества на элементарные слои толщиной  $dx$ , которые будем считать физически бесконечно узкими, так, что изменение интенсивности световой волны  $dI_x$  за счет поглощения в таком малом слое мало по сравнению с самой интенсивностью  $I_x$ . В 1729 году французский физик Пьер Бугер установил, что относительное изменение интенсивности света  $dI_x/I_x$  в каждом таком слое  $dx$  не зависит от интенсивности и пропорционально толщине этого слоя:

$$\frac{dI_x}{I_x} = -k_v dx,$$

где  $k_v$  – коэффициент пропорциональности, знак «минус» соответствует уменьшению интенсивности.

Для вычисления полного поглощения света в слое вещества конечной толщины проинтегрируем обе части полученного выражения:

$$\int_{I_0}^{I_l} \frac{dI_x}{I_x} = - \int_0^l k_v dx.$$

В результате интегрирования получим:

$$\ln \frac{I_l}{I_0} = -k_v l.$$

Проведем дальнейшие преобразования полученного выражения:

$$I_l = I_0 \cdot e^{-k_v l}.$$

Полученное выражение называется *законом Бугера*, где величина  $k_v$  – коэффициент поглощения. Коэффициент поглощения вещества в системе СИ имеет размерность  $[м^{-1}]$  и характеризует такую толщину слоя любого вещества, которая ослабляет интенсивность проходящего через нее монохроматического излучения в  $e$  раз. Эта величина характеризуется сильной и специфической для каждого вещества зависимостью от частоты света. Зависимость коэффициента поглощения от частоты определяет спектр поглощения данного вещества и часто имеет очень сложный вид.

Найдем связь между коэффициентом поглощения и коэффициентом пропускания:

$$\ln \frac{I}{I_0} = -k_v l \Rightarrow k_v = -\frac{1}{l} \ln T \quad \text{или} \quad k_v = -\frac{\lg T}{l \lg e},$$

а также между коэффициентом поглощения и оптической плотностью:

$$D = \lg \frac{1}{T} \Rightarrow k_v = \frac{D}{l \lg e} = \frac{D}{0,43l} = 2,3 \frac{D}{l}.$$

Оптическая плотность – особенно удобная характеристика при количественном молекулярном анализе, так как оптическая плотность смешанного раствора равна сумме оптических плотностей всех компонент при отсутствии взаимодействия между компонентами.

Следующая закономерность, связанная с поглощением света, предложена Бером в 1852 году. Бер установил, что поглощение света тонким слоем однородной среды пропорционально числу содержащихся в нем молекул, а, следовательно, числу их в единице объема среды, т. е. их концентрации. В случае слабых растворов при непоглощающем растворителе коэффициент поглощения пропорционален концентрации – закон Бера:

$$k_v = \chi_v \cdot c,$$

где  $\chi_v$  – коэффициент пропорциональности, зависящий от частоты и свойств молекул растворенного вещества,  $c$  – концентрация.

Закон Бера имеет гораздо более узкие границы применимости, чем закон Бугера, так как наблюдаются многочисленные отступления от него, особенно при больших концентрациях, часто коэффициент зависит от природы растворителя. При небольших концентрациях взаимодействие молекул в растворе мало и закон Бера обычно выполняется. В этом случае закон Бугера – Ламберта – Бера имеет вид

$$I_l = I_0 \cdot e^{-k_v l}.$$

Ламберт в 1760 году независимо от Бугера получил и исследовал закон поглощения света. Если концентрация поглощающих свет молекул равна  $n$ , то согласно теории мишеней, каждая молекула характеризуется эффективным сечением  $s$  (см<sup>2</sup>), называемым поперечным сечением поглощения, при попадании в которое происходит поглощение фотона. Для этого выделим в объеме образца тонкое сечение  $dx$  (рис. 1.10), перпендикулярное направлению  $I$ . Суммарная площадь мишеней, приходящаяся на 1 см<sup>2</sup> раствора толщиной  $dx$ , будет равна  $nsdx$ . Ослабление интенсивности света слоем  $dx$  равно:

$$dI = Isndx.$$

Разделив переменные и проинтегрировав, получаем:

$$\ln \frac{I_l}{I_0} = nsl,$$

откуда и найдем зависимость  $T$  от концентрации и толщины раствора:

$$T = \frac{I}{I_0} = e^{-nsl}.$$

Перейдя к более распространенным размерностям концентрации  $c$  (моль/л) и десятичному логарифму, получим выражение для оптической плотности и еще одну удобную форму записи закона Бугера – Ламберта – Бера:

$$D = -\lg T = \varepsilon lc,$$

где  $\varepsilon$  – молярный коэффициент поглощения ( $\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ), равный оптической плотности 1 М раствора, измеренной при  $l = 1$  см.

Коэффициент молярного поглощения связан с  $s$  соотношением:

$$T = e^{-nsl} = 10^{-\varepsilon c l}.$$

Из закона Бугера – Ламберта – Бера, основного закона поглощения света веществом, следует, что  $T$  и  $1 - T$  зависят от концентрации раствора ( $n$  или  $c$ ) и длины оптического пути  $l$  экспоненциально.

### 1.7. Зависимость поглощения света от химического состава, концентрации и геометрических факторов молекул

Взаимодействие света и живой материи начинается с акта поглощения фотонов и перехода молекул в возбужденное состояние. Процесс поглощения света зависит от многих факторов, определяющими из которых являются химический состав, концентрация, геометрическая конфигурация молекул и других факторов.

Зависимость оптической плотности  $D$  какого-либо объекта, например раствора, от длины волны  $\lambda$  света называют *спектром поглощения* данного объекта. Спектр раствора индивидуального соединения принято нормировать к единице концентрации и длины кюветы, т. е. спектром поглощения индивидуального вещества называют зависимость от длины волны измеряющего света молярного коэффициента поглощения  $\varepsilon$ . В качестве меры поглощательной способности образца при построении спектров поглощения используют величины  $T$ ,  $D$ ,  $k_v$  и  $\varepsilon$ :  $T$  и  $D$  – чаще для измерений в ИК-спектре, а  $k_v$  и  $\varepsilon$  – в УФ-спектре. Спектром пропускания называют зависимость пропускания образца  $T$  от длины волны  $\lambda$ . Спектр пропускания обычно используют для характеристики светофильтров, но не веществ, так как форма этих кривых зависит как от концентрации вещества, так и от толщины кюветы. Следует отметить, что оптическая плотность  $D$  есть величина аддитивная: оптическая плотность смеси двух растворов равна сумме оптических плотностей каждого из них, поскольку каждый вид частиц

поглощает в растворе независимо от других (в отсутствие химических реакций). С увеличением концентрации раствора  $c$  или длины  $l$  оптического пути света оптическая плотность растет линейно, тогда как зависимость поглощения ( $1 - T$ ) приближается к линейной только в начале графика, т. е. при малых концентрациях и оптических плотностях ([рис. 1.11](#)). Это обусловлено тем, что передние слои ослабляют свет, доходящий до задних слоев раствора. В тонких слоях раствора или в растворах низкой концентрации этим явлением можно пренебречь и зависимость поглощения от концентрации вещества (или толщины кюветы) имеет линейный характер. Количественно связь  $1 - T$  и  $D$  может быть представлена в виде

$$1 - T = 1 - 10^D.$$

Приближенное значение  $1 - T$  при малых величинах находят как первый член степенного ряда:

$$1 - T \approx \ln 10 D \approx 0,4343 D.$$

Эта формула тем точнее, чем меньше оптическая плотность раствора.

Закон Бугера – Ламберта – Бера, а значит, и представленные на [рис. 1.12](#) зависимости выполняются не всегда. Закон Бугера – Ламберта – Бера справедлив для плоскопараллельного пучка монохроматического света, проходящего через гомогенную изотропную среду при незначительной заселенности возбужденного энергетического уровня. Нарушения этих условий приводят к кажущимся отклонениям от закона Бугера – Ламберта – Бера. В частности, коэффициент  $\varepsilon$  перестает быть постоянным, а увеличивается с ростом концентрации (положительные отклонения) или уменьшается (отрицательные отклонения). Наблюдаемые отклонения от закона могут, с одной стороны, служить помехой при количественном анализе, с другой – давать дополнительную информацию о свойствах исследуемые объектов.

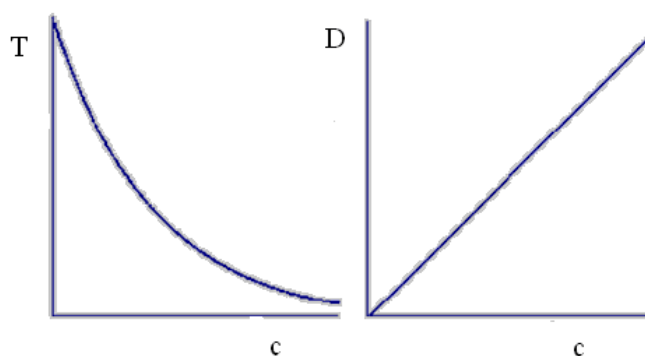


Рис. 1.12. Зависимость пропускания ( $T$ ) и оптической плотности ( $D$ ) от концентрации ( $c$ ) хромофора в растворе

Наиболее часто встречающиеся причины отклонения от закона Ламберта – Бугера – Бера можно разделить на физико-химические (связанные со свойствами вещества или раствора), инструментальные (связанные с особенностями данного спектрофотометра) и причины, связанные с анизотропией изучаемого объекта. Закон Бугера – Ламберта – Бера может не выполняться по следующим причинам:

- Хромофор распределен неравномерно, что может приводить к занижению оптической плотности вследствие эффекта сита. Занижение тем выше, чем больше оптическая плотность раствора.
- При повышении концентрации характер взаимодействия между хромофорами меняется (например, происходит агрегация молекул), то фотофизические свойства молекул, в том числе и значение коэффициента экстинкции, будут изменяться.
- Зависимость  $D$  от  $c$  может отклоняться от линейной при использовании немонахроматического света.
- В растворе под действием измеряющего света протекают фотохимические превращения хромофоров, что также будет приводить к изменению оптической плотности.
- При очень высоких интенсивностях измеряющего светового пучка не один, а несколько фотонов будут попадать на молекулу за время жизни ее в возбужденном состоянии, в результате поглощения света концентрация невозбужденных молекул может снизиться, что приведет к видимому уменьшению оптической плотности раствора.
- Рассеивание света образцом приведет к завышению  $D$ , а люминесценция образца – к занижению.

Поглощение света, как правило, одностадийный дискретный процесс длительностью  $< 10^{-14}$  с, что является проявлением квантовой природы света (рис. 1.13). Поглощение достигается в результате взаимодействия электронного облака молекулы с вектором электрического поля световой волны  $E$  (взаимодействие магнитного поля  $H$  волны мало), что является проявлением волновой природы света.

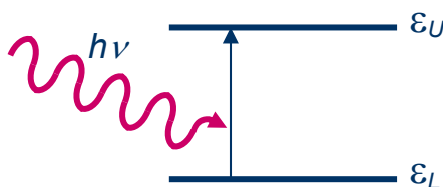


Рис. 1.13. Процесс поглощения света

Все вещества состоят из атомов, атомы же состоят из электронов и ядер. Взаимодействие видимого или ультрафиолетового света и молекул – это взаимодействие фотонов с электронами. Электроны располагаются на определенных орбиталях в атомах и молекулах, характеризующихся

определенными значениями энергии. Так как энергия квантуется, то условие совпадения  $h\nu$  и  $\Delta E$  – *основная причина возникновения спектров поглощения*. Взаимодействие между оптическим излучением и веществом приводит к превращению энергии излучения в энергию, отличающуюся по спектральному распределению, или в другую форму энергии. Переход с нижнего уровня на верхний соответствует увеличению энергии системы, т. е. поглощению внешнего фотона. Внутренняя энергия молекулы определяется запасом энергии: в электронах, в колебаниях ядер скелета молекулы, в различных вращательных движениях (рис. 1.14).

Уровни энергии, связанные с расстоянием электронных орбиталей от ядер, называют электронными уровнями энергии. Энергии переходов между уровнями для электронов внутренних оболочек лежат в диапазоне от десятков эВ до десятков кэВ (рентгеновский диапазон), переходы валентных (внешних) электронов соответствуют энергии оптического диапазона (единицы эВ).

Колебательные уровни молекул соответствуют энергии колебательных движений ядер и молекул около некоторых равновесных положений. Энергия зависит от частоты колебаний, которая, в свою очередь, определяется длиной и прочностью химических связей. Переход от колебания с одной частотой на колебания с другой сопровождается выделением или поглощением энергии, которую называют энергией колебательных переходов. Для органических молекул она лежит в пределах от 0,025 до 0,5 эВ, что соответствует поглощению квантов излучения в инфракрасной области спектра.

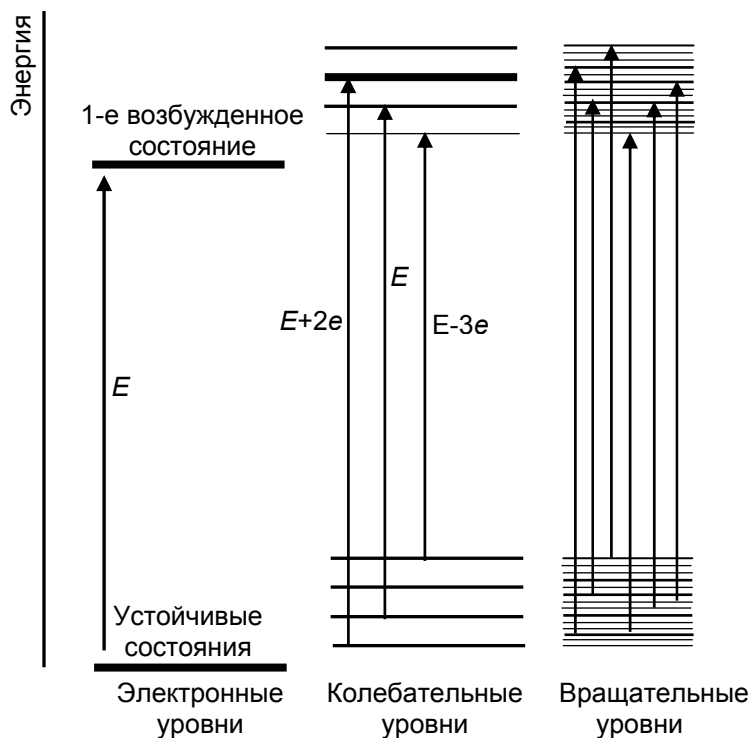


Рис. 1.14. Поглощение света



Вращательные уровни молекул связаны с вращательным движением молекулы как целого. Энергии таких переходов невелики – от сотых до сотысячных долей эВ. Такие переходы соответствуют далекой инфракрасной и микроволновой области.

Так как электронная энергия имеет порядок нескольких эВ, колебательная – десятых и сотых долей эВ, вращательная – тысячных и десятитысячных долей эВ. Именно это различие приводит к тому, что электронные, колебательные и вращательные спектры сами по себе лежат в разных спектральных диапазонах ([рис. 1.15](#)).

Дискретность энергий колебательных и вращательных переходов определяется тем, что сами энергии колебательных и вращательных уровней квантуются, т. е. могут принимать лишь определенные значения, соответствующие условиям формирования стоячих волн движущимися заряженными частицами. Совокупность таких переходов дает спектр поглощения.

При электронных переходах имеет место суммирование энергий чисто электронных переходов и энергий колебательных и вращательных. В результате такого суммирования (с положительным или отрицательным знаком) каждому электронному уровню соответствует целый набор близко расположенных к нему колебательных подуровней, а каждому колебательному подуровню – набор еще более тесно сгрудившихся вращательных подуровней.

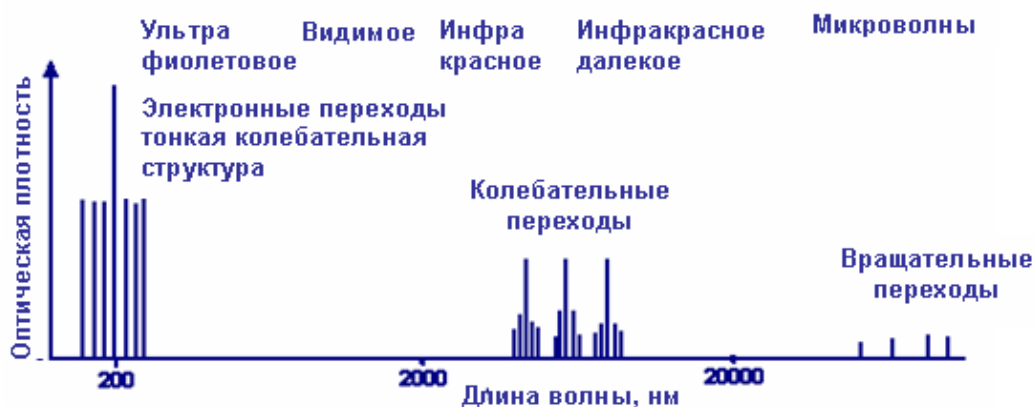


Рис. 1.15. Идеализированный спектр поглощения

Поскольку число всех уровней, подуровней весьма велико, то в молекулярных спектрах в газах наблюдается не одна или несколько, а множество отдельных линий. В растворах энергии электронных переходов изменяется под влиянием электростатического воздействия молекул растворителя, энергия которого не квантуется, благодаря чему спектры в растворах всегда представлены сплошными полосами. Схема оптических

переходов в молекуле и соответствующие им спектры представлены на [рис. 1.16](#).

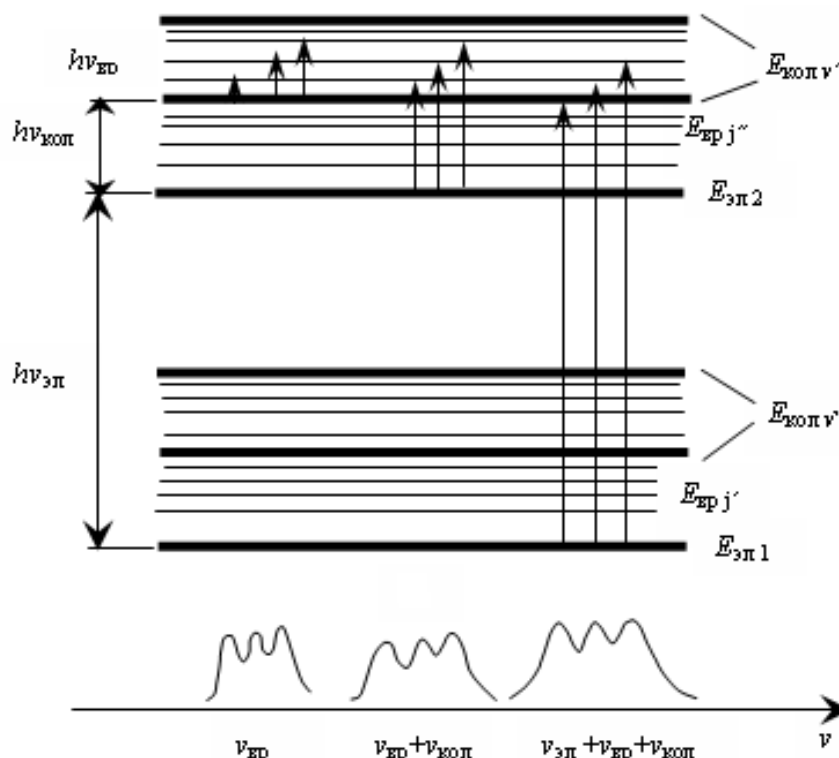


Рис. 1.16. Схема оптических переходов в молекуле и соответствующие им спектры

Схема на [рис. 1.16](#) изображена с учетом переходов:

$$\begin{aligned}
 h\nu &= (E_{эл1} - E_{эл2}) + (E_{колv'} - E_{колv''}) + (E_{врj'} - E_{врj''}) = \\
 &= \Delta E_{эл} + E_{кол} + E_{вр} = h\nu_{эл} + h\nu_{кол} + h\nu_{вр},
 \end{aligned}$$

если  $\Delta E_{эл} = \Delta E_{кол} = 0$  – вращательный переход между вращательными подуровнями какого-либо электронно-колебательного состояния, наблюдаем спектральные линии в дальнем ИК-спектре;

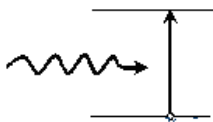
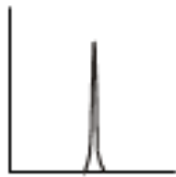
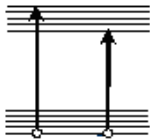
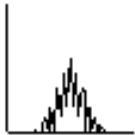
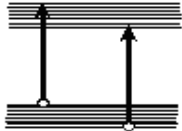
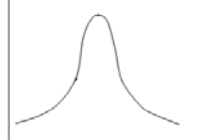
если  $\Delta E_{эл} = 0$ ,  $\Delta E_{кол} \neq 0$ ,  $\Delta E_{вр} \neq 0$  – колебательно-вращательный переход между вращательными подуровнями разных колебательных состояний при неизменном электронном состоянии – коротковолновый ИК-спектр;

если  $\Delta E_{эл} \neq 0$ ,  $\Delta E_{кол} \neq 0$ ,  $\Delta E_{вр} = 0$  – электронно-колебательно-вращательный переход – видимый или УФ-спектр.

Формы спектров поглощения дают информацию о структуре электронных молекулярных состояний, а значит, качественный и количественный анализ объекта. Для атомов и простейших молекул характерно небольшое число энергетических переходов и спектры, состоящие из небольшого числа линий – [линейчатые спектры](#) (табл. 1.3).

Таблица 1.3

Формы спектров поглощения для атома, молекулы и вещества

Поглощающий объект	Энергетический спектр	Форма спектра поглощения
Атом		
Молекула		
Сложная молекула		

Для более сложных молекул число спектральных линий велико, они сливаются, образуя отдельные полосы – полосатые спектры. Для сложных молекул спектр становится сплошным.

## 1.8. Спектры поглощения и химическая структура биологически важных соединений

Спектры поглощения биологически важных веществ представляют собой сравнительно плавные кривые с одним или несколькими максимумами. Максимум на этой кривой ( $\lambda_{\text{max}}$ ) соответствует наиболее вероятной, усредненной величине энергии электронного перехода  $E$ , которая может быть вычислена по уравнению  $E = h\nu = hc/\lambda$ . Каждая полоса поглощения в абсорбционном спектре, помимо положения максимума, может быть охарактеризована еще тремя величинами: площадью под кривой поглощения, амплитудой (оптическая плотность в максимуме поглощения) и полушириной полосы поглощения (расстояние между точками на кривой поглощения, соответствующее половине амплитуды, т. е.  $\varepsilon/2$ ) ([рис. 1.17](#)).

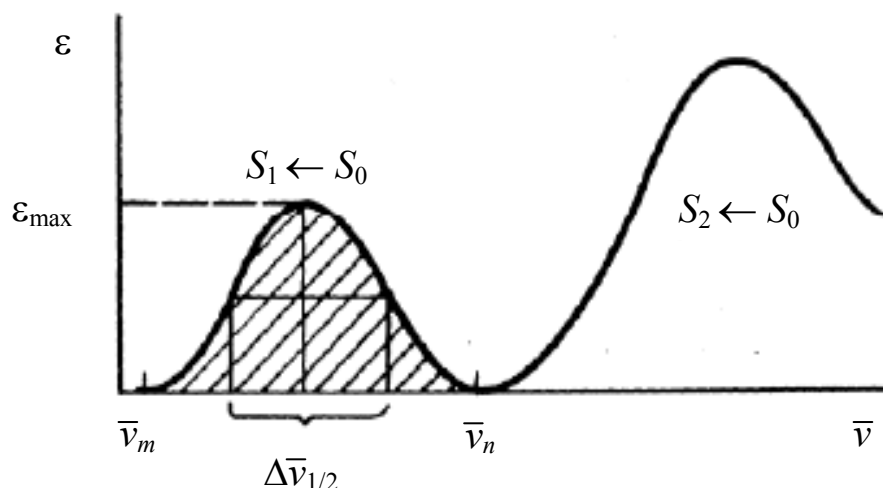


Рис. 1.17. Характеристики спектров поглощения

Площадь под кривой поглощения прямо пропорциональна безразмерной величине, называемой силой осциллятора  $f$ , которая характеризует вероятность электронных переходов в результате захвата квантов света данным хромофором:

$$f_{G \rightarrow A} = 4,32 \cdot 10^{-9} F \int_{\nu_1}^{\nu_2} \epsilon_{\nu} d\nu,$$

где  $\int_{\nu_1}^{\nu_2} \epsilon_{\nu} d\nu$  – интегральный молярный коэффициент поглощения, равный площади под соответствующей кривой поглощения;  $F$  – поправочный множитель, близкий к 1.

Электрон, поглощая фотоны той или иной энергии, может переходить на разные возбужденные электронные уровни ( $S_0^*$ ,  $S_1^*$  и т. д.), при этом в спектре поглощения вещества будет наблюдаться несколько полос. Если сложить площади полос поглощения, обусловленных переходами электронов с одной и той же электронной орбитали (*одноэлектронный переход*), то выполняется *правило сумм Томаса Куна*:  $f = 1$ , если все полосы поглощения обусловлены одноэлектронным переходом, то сила осциллятора по всем этим полосам будет равна 1, при двух электронном переходе  $f = 2$  и т. д.

Интенсивность полос поглощения является характеристикой того, с какой вероятностью происходит электронный переход из основного состояния в возбужденное. Мерами интенсивности поглощения являются молярный коэффициент поглощения  $\epsilon$  (экспериментально) сила осциллятора

$f$  (величина безразмерная). С позиции классической физики сила осциллятора служит мерой эффективного числа электронов, колебания которых обуславливают данную полосу поглощения или излучения.

Из спектров поглощения некоторых биологически важных соединений (рис. 1.18) видно, что чем больше в молекуле число сопряженных двойных связей, тем больше длина волны максимума поглощения данного вещества. В этом случае реализуются  $\pi$ - $\pi^*$ -переходы, причем сопряжение двойных связей вызывает сдвиг энергии перехода в длинноволновую область. Молекулы пероксидов жирных кислот содержат две сопряженные двойные связи (диеновые конъюгаты), максимум в спектре поглощения лежит при 233 нм.

Продукты пероксидного окисления липидов, содержащие три сопряженные двойные связи (триеновые конъюгаты), имеют максимум поглощения 260–280 нм. Ретиналь, молекулы которого содержат 6 сопряженных двойных связей, характеризуется максимумом поглощения 360 нм. Спектры поглощения трех ароматических аминокислот представлены на рис. 1.19. Максимумы поглощения и коэффициенты молярной экстинкции для биологически важных молекул представлены в табл. 1.4.

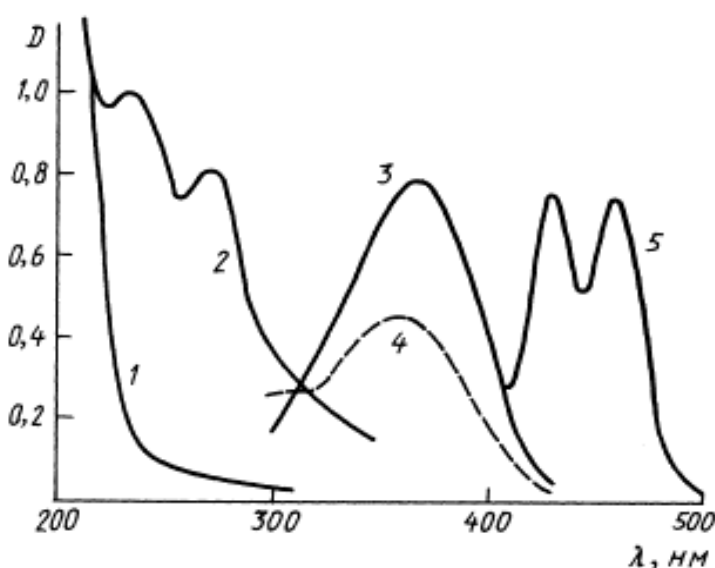


Рис. 1.18. Зависимость положения длинноволнового максимума поглощения от числа сопряженных двойных связей ( $N$ ) в молекуле: 1 – фосфолипиды, выделенные из мозга ( $N = 1$ ); 2 – окисленные фосфолипиды: диеновые конъюгаты  $\lambda_{\max} = 233$  нм ( $N = 2$ ), триеновые конъюгаты  $\lambda_{\max} = 270$ – $280$  нм ( $N = 3$ ) и, частично, карбонильные соединения; 3 – полностью-транс-ретинаяль  $\lambda_{\max} = 360$  нм ( $N = 6$ ); 5 – каротиноиды ( $N = 11$ )

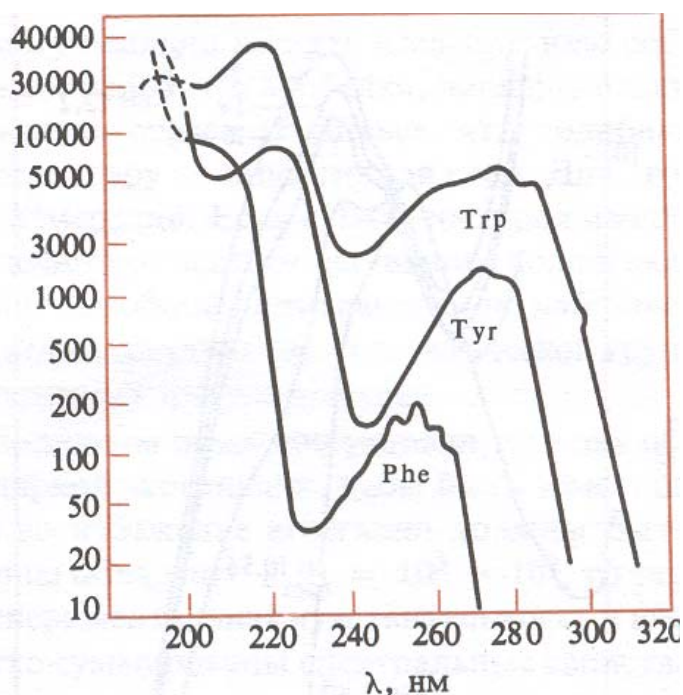


Рис. 1.19. Спектры поглощения трех ароматических аминокислот

Таблица 1.4

Максимумы поглощения и коэффициенты молярной экстинкции  
для биологически важных молекул

Соединение	$\lambda_{\max}$ , нм	$\epsilon$ при $\lambda_{\max} (\times 10^{-3})$
Триптофан <sup>a</sup>	280	5,6
	219	47,0
Тирозин <sup>a</sup>	274	1,4
	222	8,0
	193	48,0
Фенилаланин <sup>a</sup>	257	0,2
	206	9,3
	188	60,0
Гистидин <sup>a</sup>	211	5,9
Цистеин <sup>a</sup>	250	0,3
Аденин	260,5	13,4
Аденозин	259,5	14,9
Гуанин	246	10,7
Гуанозин	252,5	13,6
Цитозин	267	6,1
Цитидин	271	9,1
Урацил	259,5	8,2
Уридин	261,1	10,1
Тимин	264,5	7,9
Тимидин	267	9,7
ДНК	258	6,6
РНК	258	7,4

При переходе молекулы из основного состояния в возбужденное в ней происходит перераспределение зарядов, вызванное поглощением энергии света. Лишь переходы, вызывающие такое перераспределение, обладают заметной интенсивностью.

### 1.9. Формы спектров поглощения

Спектральные линии имеют конечную ширину, так как ширина уровней энергии, между которыми происходит оптический переход, имеет конечное значение, которое объясняется механизмом естественного уширения, основанным на квантово-механическом принципе неопределенности Гейзенберга с использованием коэффициента Эйнштейна, выражающего мощность спонтанного излучения и соответствующего электрическим дипольным переходам. Дополнительные механизмы уширения спектральных линий включают в себя: ударный, доплеровский механизмы и межмолекулярные взаимодействия в конденсированной среде. В случае *ударного механизма* за счет столкновений система может переходить из основного состояния в возбужденное и наоборот, при этом ширина спектральных линий на несколько порядков выше естественной ([рис. 1.20](#)).

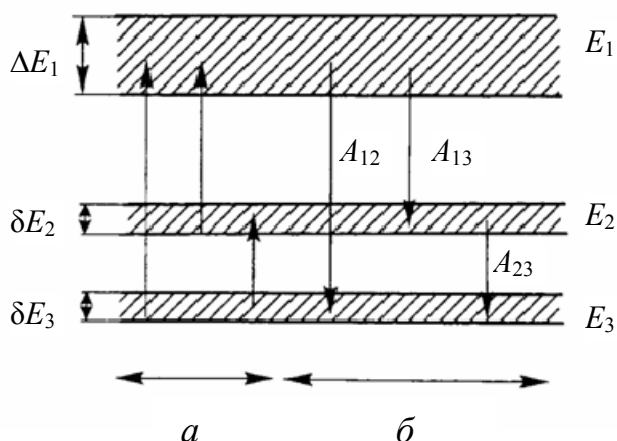


Рис. 1.20. Оптические переходы между энергетическими уровнями конечной ширины: *a* – поглощение; *б* – излучение

*Доплеровское смещение частот* происходит за счет теплового движения атомов (молекул) и рассчитывается по формулам для эффекта Доплера для неподвижного наблюдателя. Так как скорости распределены по закону Максвелла, то спектральная полоса ансамбля систем со смещенными частотами имеет гауссов контур ([рис. 1.21](#)).



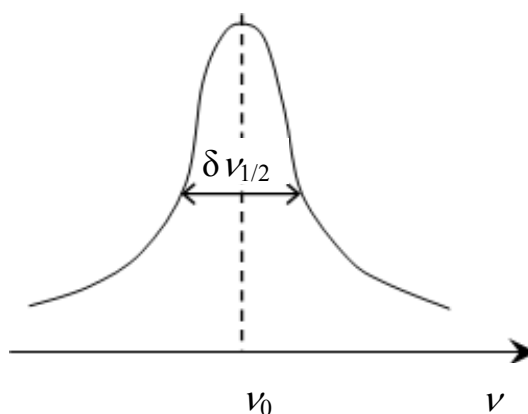


Рис. 1.21. Дисперсионный контур спектральной линии

*Межмолекулярные взаимодействия в конденсированной среде* могут быть классифицированы на два типа: вандерваальсовские (диполь-дипольные, диполь-индукционные и дисперсные) и специфические (водородная связь, комплексообразование и др.). Возникающий в этом случае потенциал межмолекулярных взаимодействий приводит к смещению уровней энергии системы, между которыми происходят оптические переходы. Смещение возбужденного энергетического уровня происходит на большую величину, чем основного, так как возбужденное состояние соответствует менее связанному состоянию системы. Кроме того, потенциал межмолекулярных взаимодействий флуктуирует из-за флуктуаций межмолекулярного расстояния, локального изменения состава ближайшего окружения молекул и др., что также приводит к уширению уровней энергии.

Узкие линии атомов и молекул в газовой фазе превращаются в широкие (размытые) спектры поглощения, характерные для растворов биомолекул. Спектры поглощения вещества в газовом состоянии и в растворе представлены на [рис. 1.22](#).

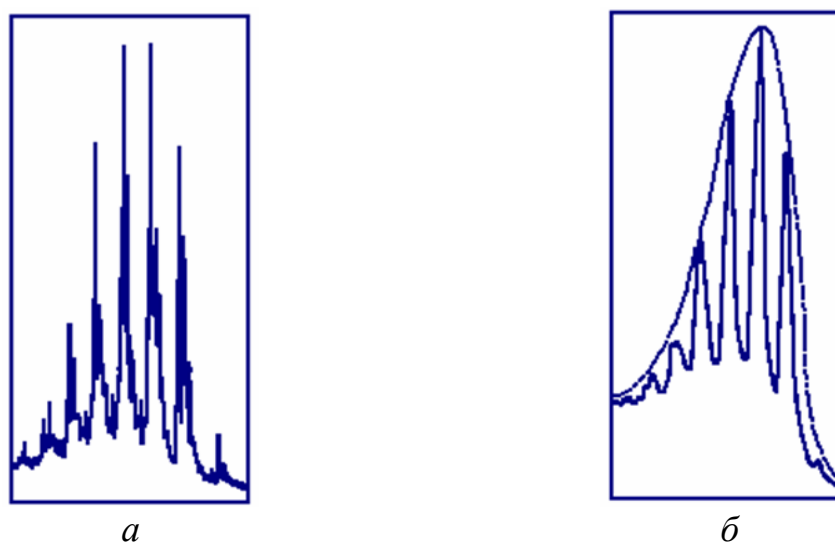


Рис. 1.22. Спектры поглощения: *а* – паров бензина; *б* – раствора бензина в спирте

Наблюдаемый эффект объясняется тем, что в растворителе и биологических системах каждая молекула хромофора окружена несколькими полярными молекулами среды, дипольные моменты которых создают локальные электрические поля. Энергия электронных переходов при наличии внешнего электрического поля несколько изменяется, а следовательно, происходит изменение длины волны света, поглощаемого при данном электронном переходе. Эти сдвиги в энергии электронного перехода для каждой молекулы зависят от ориентации молекул среды и расстояния до них в момент поглощения кванта. Величины энергии сдвигов не квантуются, они могут принимать (в определенных пределах) любые значения. Суперпозиция огромного числа смещенных линий поглощения, каждая из которых как бы соответствует индивидуальным молекулам, приводит к появлению плавной кривой поглощения раствора в целом.

Смещение уровней энергии, конденсированных по сравнению с газовой фазой, приводит к соответствующему смещению частот оптических переходов с поглощением и излучением, как правило, в длинноволновую область. Уширение уровней энергии вызывает уширение спектральных линий. Изменение частоты и полуширины спектральной линии при переходе газ – конденсированная среда представлены на [рис. 1.23](#).

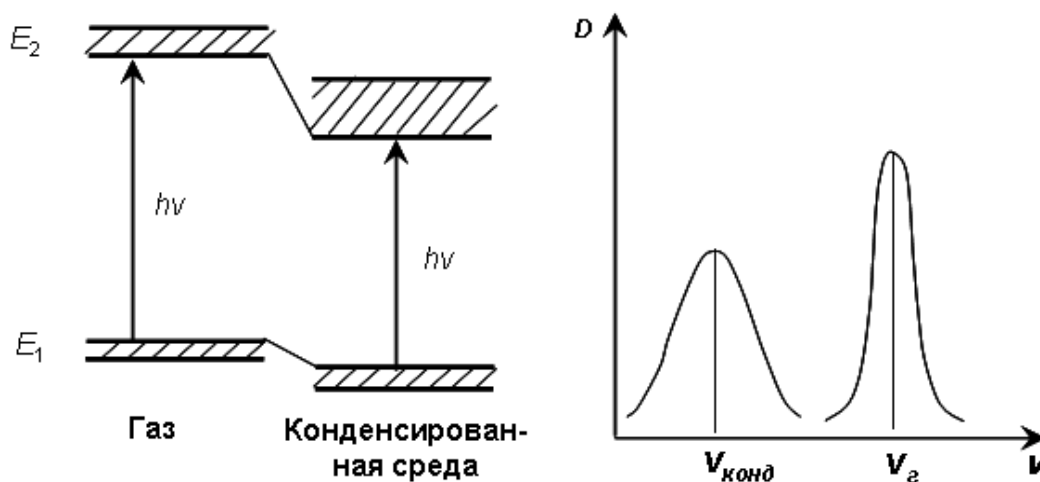


Рис. 1.23. Изменение частоты и полуширины спектральной линии при переходе газ – конденсированная среда

Электронные полосы поглощения имеют полуширину порядка десятков нанометров. За счет флуктуации межмолекулярных взаимодействий происходит уширение колебательно-вращательных линий и их слияние. Так как в конденсированной среде вращение заторможено, то интенсивность вращательных переходов ниже, чем в газе.

## 1.10. Электронно-возбужденные состояния молекул. Схема Яблонского

Первичными стадиями фотобиофизического процесса являются поглощение света хромофорной группой и образование электронно-возбужденных состояний (ЭВС). При поглощении света молекулы, ионы, атомы, радикалы и другие типы частиц, участвующих в химических превращениях, могут переходить в электронно-возбужденные состояния. В них происходит изменение физических и химических свойств молекул по сравнению с основным состоянием. Меняются дипольный момент, геометрия, распределение электронной плотности, кислотно-основные свойства и т. д., и молекулы в возбужденном состоянии обладают иной реакционной способностью, что проявляется не столько в изменении скорости реакции, сколько в их ином, по сравнению с основным состоянием, направлении. Поглощение и испускание света хорошо иллюстрирует диаграмма уровней энергии, предложенная Яблонским (рис. 1.24).

В основном состоянии все электроны занимают самые низшие электронные уровни и расположены на орбиталях попарно, причем их спины имеют противоположное направление (антипараллельны). Такое состояние молекулы называют синглетным невозбужденным (основным) состоянием и обозначают как  $S_0$ . Так же обозначают энергетический уровень невозбужденной молекулы.

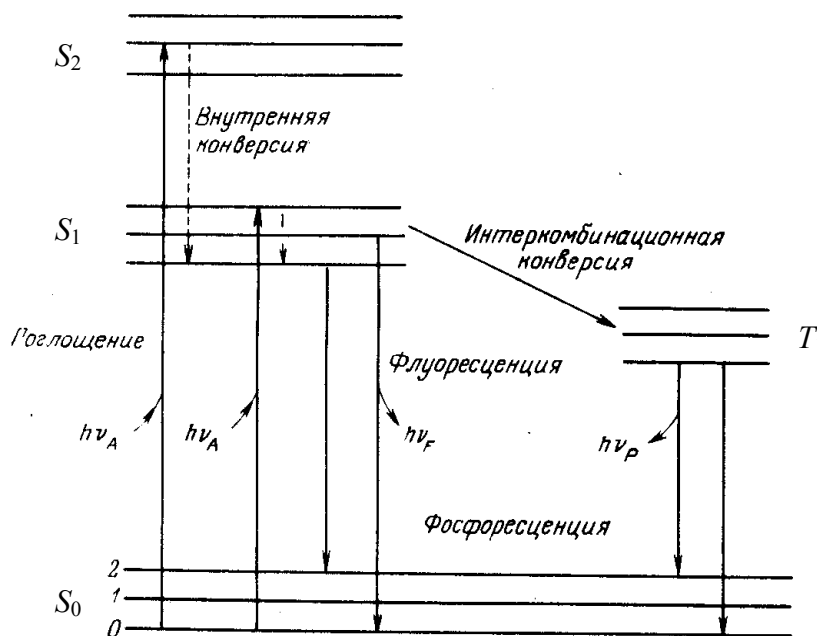


Рис. 1.24. Упрощенная диаграмма Яблонского

При поглощении света происходит переход одного из электронов на вышележащую орбиталь, но его спин не меняется. Такое состояние молекулы и ее энергетический уровень обозначают как  $S_1$  или  $S_2$  в зависимости от того, на какой уровень перешел электрон. Это синглетное возбужденное состояние

иногда обозначают как  $S^*$ . Основное, первое и второе электронные состояния обозначают  $S_0$ ,  $S_1$ , и  $S_2$  соответственно. Каждый из этих уровней энергии может состоять из множества колебательных энергетических уровней, обозначаемых 0, 1, 2 и т. д. Влияние растворителя в данной схеме во внимание не принимается. Переходы между различными электронными уровнями обозначены вертикальными линиями. Такое представление используется, чтобы наглядно показать мгновенную природу поглощения света. Этот процесс происходит примерно за  $10^{-15}$  с – время, слишком короткое для заметного смещения ядер (принцип Франка – Кондона).

Отношение  $R$  числа молекул в двух состояниях с разностью энергий  $\Delta E$  определяется

$$R = e^{-\Delta E/kT},$$

где  $k$  – константа Больцмана;  $T$  – абсолютная температура, К. При комнатной температуре 300 К отношение  $R$  равно  $\sim 0,01$ . Следовательно, большинство молекул будет находиться в самом нижнем колебательном состоянии; именно такие молекулы и поглощают свет. Из-за большой разности энергий между уровнями  $S_0$  и  $S_1$ , по существу, ни у каких флуорофоров состояние  $S_1$  не может быть заселено термическим путем. Даже малое термически активированное заселение первого возбужденного колебательного состояния молекул можно зарегистрировать, используя различие спектров поглощения при разных температурах. Потенциальные кривые основного и возбужденного состояния двухатомной молекулы и форма полосы поглощения представлены на [рис. 1.25](#).

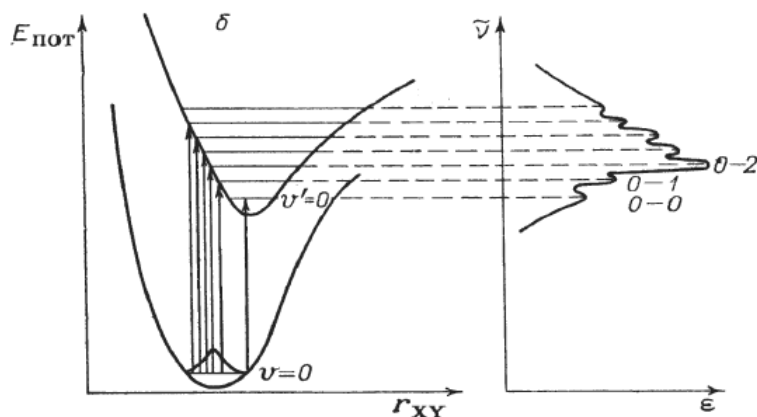


Рис. 1.25. Потенциальные кривые основного и возбужденного состояния двухатомной молекулы и форма полосы поглощения

Относительные интенсивности переходов между колебательными уровнями двух электронных состояний, проявляющиеся в спектрах поглощения или испускания объясняются в рамках принципа Франка – Кондона. [Принцип Франка – Кондона](#) состоит в том, что электронные переходы являются настолько быстрыми ( $10^{-14}$ – $10^{-15}$  с) по сравнению с движением ядер в молекуле ( $10^{-12}$ – $10^{-13}$  с), что за время электронного

перехода относительное расположение ядер и их кинетическая энергия практически не изменяются ([рис. 1.26](#)). Отсюда следует, что переход можно представить вертикальной линией, соединяющей различные поверхности потенциальной энергии, причем наиболее вероятным окажется переход на тот колебательный уровень, который имеет то же значение межъядерного расстояния в точке поворота колебаний. Только в том случае, если равновесные межъядерные состояния в основном и возбужденном состоянии равны, то наиболее интенсивным является 0–0-переход. На [рис. 1.26](#) показано, что наиболее вероятными переходами являются 0–0 и 0–2 при поглощении. Иные переходы менее вероятны, поскольку в них молекула должна мгновенно приобрести избыток кинетической энергии.

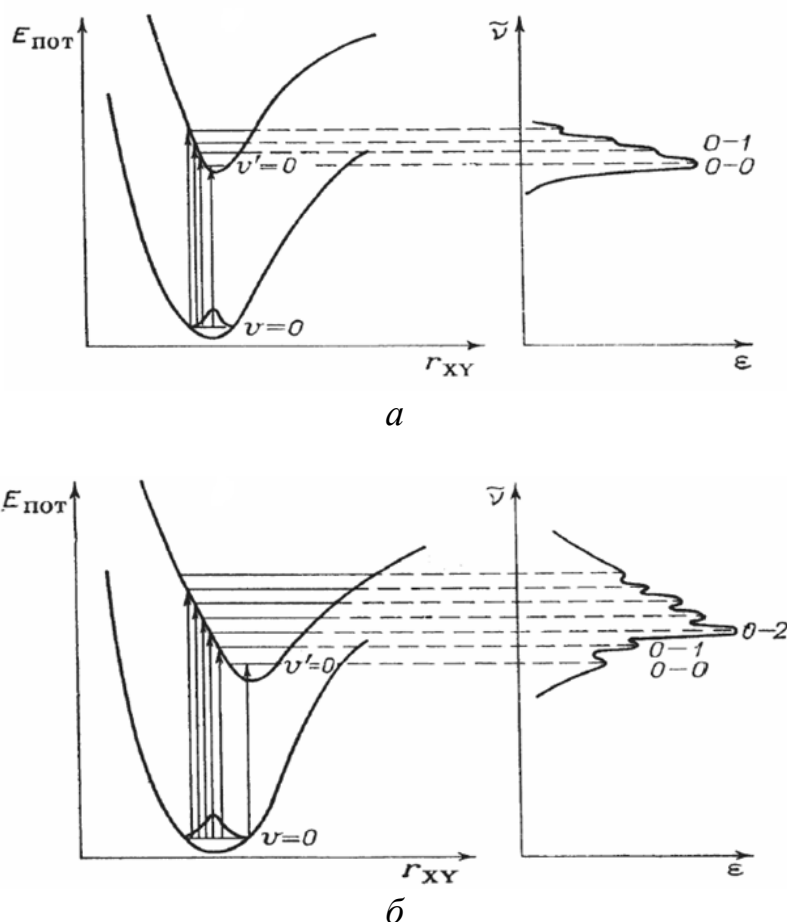


Рис. 1.26. Потенциальные кривые основного и возбужденного состояний двухатомной молекулы  $XY$  и форма полос поглощения:

$a$  – в случае одинаковых межъядерных расстояний;

$b$  – в случае различных межъядерных расстояний в основном и возбужденном состояниях

Поскольку с увеличением энергии колебательные уровни сближаются вплоть до достижения континуума и, кроме того, в многоатомной молекуле кривая потенциальной энергии переходит в многомерную поверхность, то данному электронному переходу соответствует множество колебательных переходов, расположенных достаточно близко и перекрывающихся с образованием широкой полосы поглощения. Общая форма полосы

поглощения определяется принципом Франка – Кондона, а ее огибающая называется огибающей Франка – Кондона.

За поглощением света обычно следует несколько других процессов. Возбуждение флуорофора, как правило, происходит до некоторого высшего колебательного уровня состояний ( $S_1$  либо  $S_2$ ). За некоторыми редкими исключениями для молекул в конденсированной фазе характерна быстрая релаксация на самый нижний колебательный уровень состояния  $S_1$ . Этот процесс называется внутренней конверсией и происходит большей частью за  $10^{-2}$  с. Поскольку типичные времена затухания флуоресценции близки к  $10^{-8}$  с, внутренняя конверсия обычно полностью заканчивается до процесса испускания. Следовательно, испускание флуоресценции чаще всего осуществляется из термически равновесного возбужденного состояния. Аналогично поглощению обратный переход электронов на самый нижний электронный уровень также приводит к колебательно-возбужденному состоянию. Термическое равновесие достигается за время порядка  $10^{-12}$  с. Интересным следствием из такого рассмотрения является то, что спектр поглощения молекулы отражает колебательную структуру возбужденных электронных состояний, а спектр испускания – колебательную структуру основного электронного состояния. В большинстве случаев электронное возбуждение не сильно изменяет расположение колебательных уровней энергии. В результате этого колебательные структуры, проявляющиеся в спектрах поглощения и испускания, сходны.

Молекулы в состоянии  $S_1$  могут также подвергаться конверсии в первое триплетное состояние  $T_1$ . Конверсия из  $S_1$  в  $T_1$  называется интеркомбинационной конверсией. Переход из  $T_1$  в основное состояние запрещен, в результате чего константа скорости такого испускания на несколько порядков меньше соответствующей константы для флуоресценции.

При определенных условиях может произойти обращение спина электрона, находящегося на верхней орбитали возбужденной молекулы, при этом часть его энергии теряется. Состояние молекулы, содержащей два электрона с параллельными спинами, называется триплетным состоянием, а энергетический уровень электрона с обращенным спином называют триплетным уровнем. Прямой переход электрона с триплетного уровня  $T_1$  на основной уровень  $S_0$  невозможен, так как в этом случае на одной и той же орбитали оказались бы два электрона с параллельными спинами, что противоречит квантово-механическому принципу Паули. При определенной конфигурации молекулы и окружения электрон все же спускается вниз с одновременным обращением спина с высвечиванием фотона с меньшей энергией. Замедленное и более длинноволновое излучение из  $T_1$ , называемое



фосфоресценцией, обычно сдвинуто в сторону больших длин волн (меньших энергий) по сравнению с флуоресценцией.

## 1.11. Основные фотометрические величины

Поток излучения  $\Phi$  (Вт или Эйнштейн/с) равен энергии, переносимой через некоторую поверхность  $S$  за единицу времени  $t$ :

$$\Phi = W/t.$$

*Интенсивность полос поглощения* является характеристикой того, с какой вероятностью происходит электронный переход из основного состояния в возбужденное. Интенсивность света  $I$ , КВт/м<sup>2</sup> или Эйнштейн/(м<sup>2</sup>·с), выражают в виде плотности потока излучения, т. е. потока, падающего на единицу площади, перпендикулярной к направлению распространения света:

$$I = \Phi/S_{\perp}.$$

Доза излучения  $D$  (Дж/м<sup>2</sup> или Эйнштейн/м<sup>2</sup>) – энергетическая экспозиция, количество облучения, экспозиционная доза, равная произведению интенсивности на длительность облучения:

$$D = It.$$

Сила осциллятора – вероятность поглощения  $f$ , т. е. параметр, характеризующий полосы поглощения. С позиции классической физики сила осциллятора служит мерой эффективного числа электронов, колебания которых обуславливают данную полосу поглощения или излучения. В квантовой механике сила осциллятора для электронного перехода из основного состояния, имеющего волновую функцию  $\Psi_G$ , в возбужденное состояние, имеющее волновую функцию  $\Psi_A$ , выражается следующим образом:

$$f_{G \rightarrow A} = \frac{8\pi^2 m c \nu_{G \rightarrow A} g}{3 h e^2} |Q_{G \rightarrow A}|^2 \quad \text{или} \quad f_{G \rightarrow A} = 8,75161 \cdot 10^{-2} \Delta E_{G \rightarrow A} |Q_{G \rightarrow A}|^2,$$

где  $m$  – масса электрона;  $e$  – заряд электрона;  $c$  – скорость света;  $g$  – степень вырождения возбужденного состояния;  $\nu$  – волновое число полосы поглощения ( $\nu = 1/\lambda = \nu/c$ , см<sup>-1</sup>);  $\Delta E_{G \rightarrow A}$  – энергия электронного перехода;  $Q_{G \rightarrow A}$  – момент перехода.

При переходе молекулы из основного состояния в возбужденное в ней происходит перераспределение зарядов, вызванное поглощением энергии



света и лишь переходы, обуславливающие такое перераспределение, обладают заметной интенсивностью. Это заключение подтверждается приведенным соотношением, связывающим силу осциллятора и квадрат момента перехода:

$$f_{G \rightarrow A} = 8,75161 \cdot 10^{-2} \Delta E_{G \rightarrow A} |Q_{G \rightarrow A}|^2.$$

*Момент перехода* представляет собой вектор, для которого можно выполнить разложение по декартовым осям:

$$Q_{G \rightarrow A} = Q_{x, G \rightarrow A} + Q_{y, G \rightarrow A} + Q_{z, G \rightarrow A}.$$

По определению момент перехода выражается следующим интегралом по всему объему:

$$Q_{G \rightarrow A} = \int \Psi_G R \Psi_A d\tau,$$

где  $\Psi_G$  – волновая функция основного состояния;  $\Psi_A$  – волновая функция возбужденного состояния;  $R$  – оператор дипольного момента:

$$R = e \sum_i r_i = R_x + R_y + R_z,$$

где  $r_i = x_i + y_i + z_i$  – оператор дипольного момента для  $i$ -го электрона.

Электронный переход происходит только в том случае, если хотя бы один из компонентов момента перехода  $Q_{x, G \rightarrow A}$ ,  $Q_{y, G \rightarrow A}$ ,  $Q_{z, G \rightarrow A}$  не равен нулю. Соотношение этих компонентов определяет направление, в котором поляризован электронный переход, т. е. если хотя бы один из компонентов отличен от нуля, то переход поляризован вдоль этой оси.

Влияние правил отбора на интенсивность электронных переходов приближенно можно оценить из соотношения

$$F = f_s f_0 f_{sym} F_A,$$

где  $F_A$  – сила осциллятора полностью разрешенного перехода, близкая по величине к единице,  $F$  – сила осциллятора рассматриваемого перехода,  $f_s, f_0, f_{sym}$  – множители, вносящие поправки на различную степень запрещенности рассматриваемого перехода. При этом величины этих множителей составляют:  $f_s$  (спин)  $\sim 10^{-8}$  для ароматических углеводов,  $\sim 10^{-5}$  для элементов второго ядра;  $f_0$  (перекрывание орбиталей)  $\sim 10^{-2}$  для  $n \rightarrow \pi^*$ -переходов элементов второго ядра;  $f_{sym}$  (симметрия)  $\sim 10^{-1} - 10^{-3}$ .

Спиновый отбор: электронные переходы между состояниями различной мультиплетности запрещены. Строгий запрет по спину выполняется только для ограниченного числа малоатомных молекул со слабой спин-орбитальной связью. Тем не менее синглетно-триплетные

переходы наблюдаются достаточно редко из-за низкой интенсивности ( $\epsilon \approx 10^{-3} \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ).

Отбор по симметрии: электронный переход из основного состояния является разрешенным по симметрии тогда, когда свойства симметрии произведения волновых функций основного и возбужденного состояний  $\Psi_G \Psi_A$  совпадают хотя бы одного из операторов дипольного момента перехода. Вероятность того, что электронный переход запрещен по симметрии тем больше, чем выше симметрия молекулы, поскольку в этом случае снижается вероятность совпадения свойств симметрии возбужденного состояния и компонентов оператора дипольного момента перехода.

Отбор по перекрыванию: правила отбора по перекрыванию связаны с различными пространственными свойствами орбиталей, затрагиваемых в процессе электронного перехода. Так,  $n \rightarrow \pi^*$ -переходы в молекулах, содержащих гетероатомы, запрещены, если  $n$ -орбитали являются «чистыми» локализованными на гетероатомах  $p$ -орбиталями, и разрешены, если они являются  $s$ -орбиталями или гибридными с большой долей  $s$ -орбиталей.

## 1.12. Спектры поглощения и спектры действия. Сечение фотохимической реакции

Одна из задач при изучении фотобиологических процессов – определение вещества, которое поглощает действующее излучение и тем самым участвует в первых стадиях процесса. Для этого изучают спектр фотохимического действия и сравнивают его со спектрами поглощения предполагаемых участников реакции. Спектр действия – зависимость относительной эффективности изучаемого явления от длины волны возбуждающего света. Молекулярное поглощение фоторадиации – первичная стадия фотобиологического процесса, приводящая к фотохимическим изменениям молекулы: фотохимическое обесцвечивание органического красителя, фотоинактивация белка, повреждение молекул нуклеиновых кислот, окисление липидов и др. Чем больше показатель поглощения вещества, тем интенсивнее реакция.

Для получения спектров действия идентичные образцы изучаемой биологической системы облучают квазимонохроматическим излучением в различных участках предполагаемого спектра поглощения фоторецептора. Идентификацию фоторецептора проводят, сравнивая спектр действия со спектрами поглощения известных молекул. Необходимое условие для этого – линейная связь между поглощенной фоторецептором световой энергией (измеряют полную поглощенную энергию) и величиной параметра, отражающего эффективность воздействия.

В тех участках, где поглощение фотонов рецептором отсутствует, эффект не наблюдается, а там, где поглощение фотонов рецепторов максимально, – развивается наиболее интенсивно. Если зондирующий луч

попал в нужную спектральную область, фоторецепторы проявят себя, сколько бы их ни было, – клетки сами усилят слабый сигнал.

Как объективный метод исследования спектр действия был предложен К. А. Тимирязевым, доказавшим с его помощью, что хлорофилл является фоторецептором в фотосинтезе. Тимирязев использовал в качестве источника света солнечный луч, разлагая его по спектру с помощью призмы. Под цветными лучиками он расставлял колбы с растениями и по объему выделяющегося кислорода измерял эффективность фотобиологической реакции.

Для характеристики фотохимической реакции используется понятие «фоточувствительность», или «поперечное сечение реакции фотохимического процесса» ( $\sigma$ ):

$$\sigma = Q \cdot s,$$

где  $s$  – поперечное сечение поглощения активного света;  $Q$  – квантовый выход реакции. Зависимость  $s$  от длины волны падающего на объект излучения формирует спектр поглощения данного объекта.

Для определения поперечного сечения реакции фотохимического процесса  $\sigma$  рассмотрим модельную систему: пусть рассматриваемый образец содержит  $N = nSl$  – всего молекул в кювете, где  $S$  (м<sup>2</sup>) – сечение кюветы,  $l$  (см) – толщина кюветы,  $n$  (см<sup>-3</sup>) – концентрация молекул. Пусть  $\Phi_0 = I_0S$  – поток квантов света, падающих на раствор, а  $\Phi = IS$  – поток поглощенных фотонов. Каждую секунду раствор поглощает  $I_{\text{погл}} = I_0S - IS$  фотонов.

Так как  $T = \frac{I}{I_0}$ , то  $(I_0S - IS) = I_0S(1-T)$ , где  $T$  – пропускание. Квантовый

выход определим как отношение числа прореагировавших молекул  $N$  к числу поглощенных фотонов  $I_{\text{погл}}$ :  $Q = N/I_{\text{погл}}$ , и выразим число молекул:

$$N = Q I_{\text{погл}} = Q I_0S(1-T).$$

При этом в растворе ежесекундно инактивируется:

$$\frac{d(nSl)}{dt} = QI_0S(1-T)$$

или

$$\frac{dn}{dt} = QI(1-T)/l.$$

Вспомнив, как пропускание связано с геометрическими размерами кюветы и концентрацией образца

$$T = \frac{I}{I_0} = e^{-nsl},$$

и подставив в полученное выражение, получим:

$$\frac{dn}{dt} = QI_0(1 - e^{-nsl})/l.$$

В разбавленных растворах  $nsl \ll 1$ , поэтому полученное выражение принимает вид

$$\frac{dn}{dt} = QI_0ns.$$

Разделим переменные:

$$\frac{dn}{n} = QI_0sdt.$$

Проинтегрировав выражение

$$\int_{n_0}^n \frac{dn}{n} = QI_0s \int_0^t dt,$$

получим:

$$\ln \frac{n_0}{n} = QI_0st,$$

где  $s$  – поперечное сечение поглощения света. Перепишем полученную формулу:

$$\ln \frac{n_0}{n} = \sigma D,$$

где  $D$  – доза облучения,  $\sigma$  – поперечное сечение реакции фотохимического процесса. Для определения поперечного сечения реакции фотохимического процесса нужно построить график зависимости:

$$\ln n = f(D),$$

и из наклона прямой можно найти  $\sigma$  ([рис. 1.27](#)).

Примеры экспериментально полученных спектров действия для различных биологических объектов представлены на [рис. 1.28–1.30](#). В

частности, из [рис. 1.28](#) можно провести сравнительный анализ спектра действия и спектра поглощения для процесса возникновения мутаций у кукурузы и сделать вывод о том, что мутации связаны с повреждением нуклеиновых кислот.

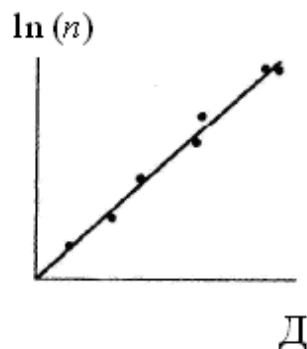


Рис. 1.27. Определение поперечного сечения реакции фотохимического процесса

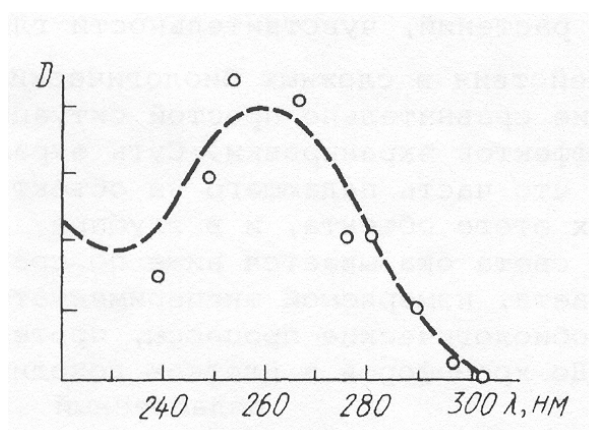


Рис. 1.28. Спектр действия возникновения мутаций у кукурузы:  
--- — оптическая плотность; о — эффективность УФ-индукции мутаций

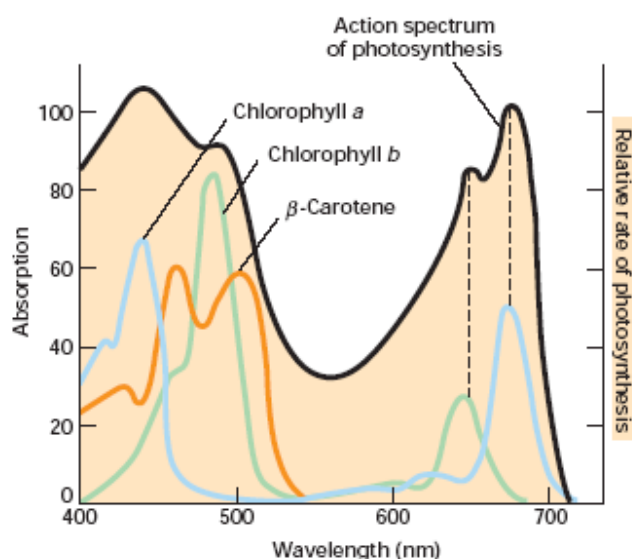


Рис. 1.29. Спектр действия фотосинтеза

В области 220 и 280 нм поглощение белка обусловлено в основном поглощением ароматических аминокислот (тирозин, триптофан, фенилаланин), гистидина и серосодержащих (цистеин, метионин, цистин). Фотоны, поглощаемые ароматическими и серосодержащими аминокислотами, участвуют в инаktivации фермента, но эффективность последних несколько выше (область 240–250 нм – сульфгидрильных (–SH) и дисульфидных (–SS–) групп цистеина и цистина). Спектры поглощения трипсина и спектры действия (инаktivации) трипсина под действием УФ-облучения представлены на [рис. 1.30](#).

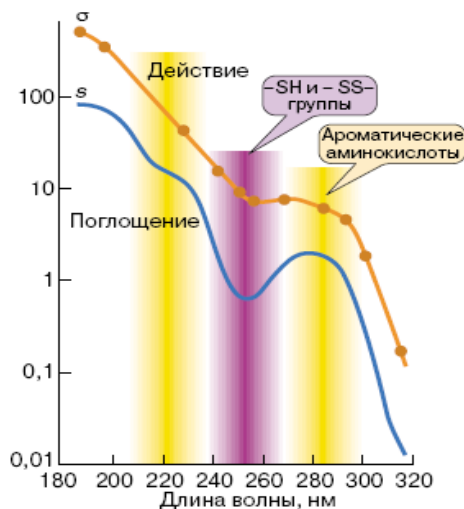


Рис. 1.30. Спектры поглощения трипсина и спектры действия (инаktivации) трипсина под действием УФ-облучения

Изучение спектров действия фотобиологических процессов позволяет установить, какие длины волн необходимы и наиболее эффективны для возникновения и поддержания реакции. Спектр действия представляет собой зависимость величины биологического эффекта от длины волны действующего света – зависимость  $\sigma$  от длины волны излучения. Вещество, ответственное за поглощение биологически активного света, выявляется с помощью спектра действия фотобиологической реакции.

### 1.13. Искажения спектров в биологических объектах. Влияние рассеяния света на измерения

При измерениях спектров поглощения биологических объектов, таких как целая ткань или суспензия клеток, могут возникнуть искажения, причиной которых могут быть эффект многократного отражения и рассеяния света на частицах, эффект сита или проскока. При прохождении пучка света интенсивностью  $I_0$  через объект, в котором окрашенное вещество распределено неравномерно, ослабление пучка будет различным в тех местах, где свет проходит через окрашенные частички  $I_a$  и  $I_k$ , и там, где он их минует ([рис. 1.31](#), [рис. 1.32](#)). Этот эффект носит название «*эффект сита*».

Поглощение света суспензией окрашенных частиц (например эритроцитов) отличается от поглощения света раствором окрашенного вещества (например раствором гемоглобина, вышедшего из эритроцитов при гемолизе). В зависимости от ориентации, эритроциты пропускают в максимуме поглощения 418 нм всего 36–77 % света, а в максимуме 540 нм – 88–97 %. Из этих данных видно, что в синей области спектра (в полосе Соре) эритроцит поглощает значительную долю падающего на него светового потока.

Эффект сита сказывается тем сильнее, чем больше неравномерность распределения поглощающего вещества и чем выше оптическая плотность частиц. В результате оптическая плотность суспензии оказывается ниже, чем оптическая плотность раствора оксигемоглобина, что имеет место главным образом в области 418 нм, где оптическая плотность этого гемопротеида особенно велика. Эффект сита приводит к сглаживанию спектров поглощения.

Любое вещество обладает способностью частично рассеивать электромагнитную радиацию. В результате светорассеяния происходит отклонение измеряющего светового пучка от первоначального направления, вследствие чего не весь прошедший свет попадает на фотоприемник. Это приводит к завышению измеряемой оптической плотности. Интенсивность светового потока вдоль первоначального направления уменьшается тем сильнее, чем больше размер частиц.

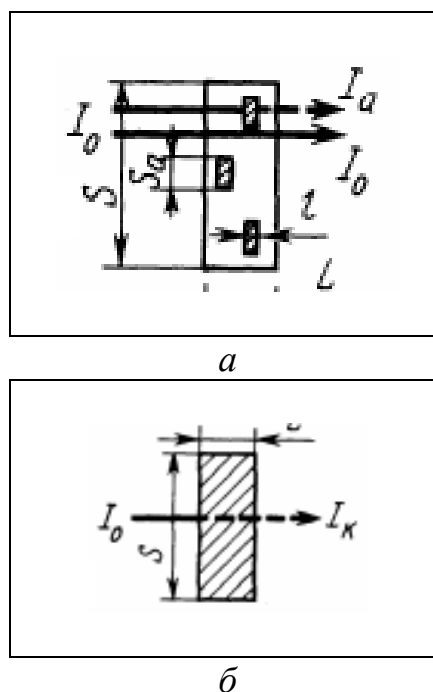


Рис. 1.31. Эффект сита: *a* – прохождение пучка через суспензию эритроцитов; *б* – прохождение пучка через гемолизат



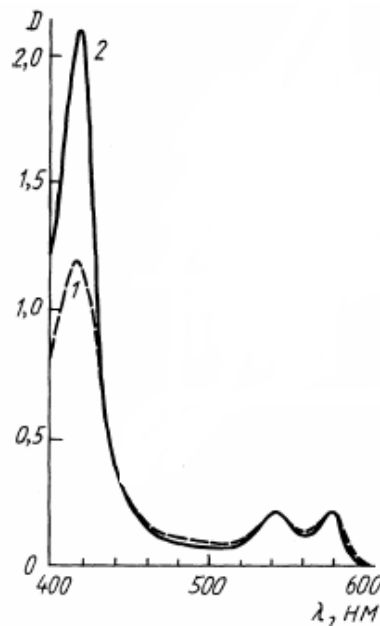


Рис. 1.32. Эффект сита в суспензии эритроцитов:  
1 – прохождение пучка через суспензию эритроцитов;  
2 – тот же образец после гемолиза

С учетом эффекта светорассеяния в законе Ламберта – Бугера – Бера на показатель поглощения  $k_v$  накладывается дополнительный смысл:

$$I_l = I_0 \cdot e^{-k_v l},$$

где  $k_v$  – *показатель ослабления*:  $k_v = a + b$ ,  $a$  – показатель поглощения,  $b$  – полный показатель рассеяния:

$$b = 2\pi \int_0^\pi b(\varphi) \sin \varphi d\varphi.$$

Полный показатель рассеяния  $b$  складывается из показателя рассеяния вперед  $\delta$  (в передней полусфере относительно центра рассеяния) и показателя рассеяния назад  $\beta$  (в задней полусфере) и определяется по формуле

$$b = \delta + \beta,$$

где выражения для  $\delta$  и  $\beta$  имеют вид:

$$\delta = 2\pi \int_0^{\pi/2} b(\varphi) \sin \varphi d\varphi \quad \text{и} \quad \beta = 2\pi \int_{\pi/2}^\pi b(\varphi) \sin \varphi d\varphi.$$

Рассеяние – это изменение направления, частоты и поляризации оптического излучения при взаимодействии с веществом. Различают рассеяние, при котором частота падающего излучения не меняется

(рэлеевское рассеяние, зависящее от неравномерного распределения молекул в среде, и рассеяние света в мутной среде, например, в суспензии клеток или митохондрий – эффект Тиндаля), и рассеяние, при котором частота падающего излучения изменяется (комбинационное рассеяние, или эффект Рамана). Комбинационное (рамановское) рассеяние, сопровождающееся изменением колебательной энергии рассеивающих частиц лежит в основе *метода комбинационного рассеяния (рамановской спектроскопии)*. Например, рэлеевское рассеяние (*Rayleigh scattering*) наблюдается, когда длина волны  $\lambda$  много больше размеров неоднородностей  $d$ :  $\lambda \gg d$  (например, размеры клетки – 10 мкм). Рэлеевским рассеянием объясняется, в частности, голубой цвет неба, поскольку более коротковолновый (голубой) свет рассеивается сильнее, чем длинноволновый. Полный показатель рассеяния  $b$  для рэлеевского рассеяния рассчитывается по формуле

$$b(\varphi) = b(\varphi)(1 + \cos^2 \varphi).$$

Направленное монохроматическое излучение в малом неоднородном слое описывается рассеянием Ми (*Mie scattering*) в условиях, когда  $\lambda \geq d$ :

$$I = I_0 e^{-\int_0^l k(x) dx}.$$

Квантовые переходы при рассеянии обозначаются наклонными стрелками. Промежуточные состояния, через которые совершаются оптические переходы при рассеянии, не являются стационарными и называются виртуальными (обозначаются пунктиром). Схема оптических переходов для рассеяния и соответствующий ей спектр представлены на [рис. 1.33](#).

Введение поправок на светорассеяние основывается на представлениях о том, что поглощение и рассеяние света являются независимыми процессами. Измеренная кривая оптической плотности есть сумма истинного поглощения  $D_{\text{ист}}$  и поглощения, вызванного светорассеянием  $D_{\text{расс}}$ , т. е. эти плотности связаны соотношением

$$D_{\text{ист}} = D - D_{\text{расс}}.$$

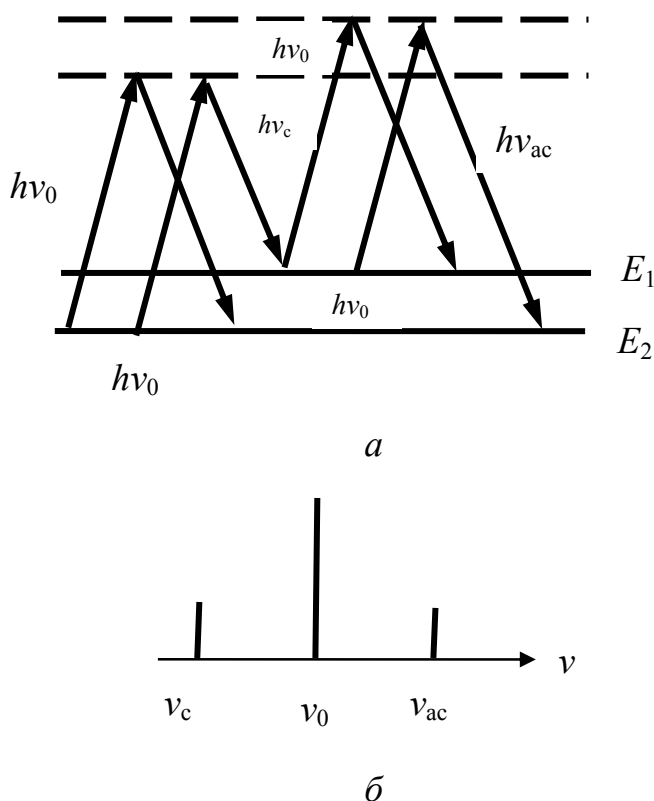


Рис. 1.33. Схема оптических переходов для рассеяния (а) и соответствующий ей спектр (б):  
 $\nu_0$  – частота падающего кванта; частота излучаемых квантов:  
 $\nu_0$  – упругое (рэлеевское рассеяние);  $\nu_c$ ,  $\nu_{ac}$  – неупругое (комбинационное) рассеяние  
 $(\nu_c < \nu_0$  – стоксовы частоты,  $\nu_{ac} > \nu_0$  – антистоксовы частоты)

Спектры поглощения раствора экспериментальный и истинный, а также кажущееся поглощение из-за светорассеяния представлены на [рис. 1.34](#). Истинное поглощение раствора находится как кривая 1 минус кривая 2. На основе этого выражения применяется графический метод введения поправки на светорассеяние, который основан на построении графика  $\lg D = f(\lg \lambda)$  ([рис. 1.35](#)):

$$\lg D_s = \lg a - n \lg \lambda,$$

где  $a$  и  $n$  – константы, причем в зависимости от формы и размеров частиц  $n$  может иметь значения от 0 до 4. Такое преобразование формулы дает то, что  $\lg D_s$  – линейная функция  $\lg \lambda$ . Если раствор не поглощает, то в рассматриваемом диапазоне длин волн получим прямую. Тангенс угла наклона прямой дает величину  $n$ , а отрезок, отсекаемый на оси ординат, равен  $\lg a$ .

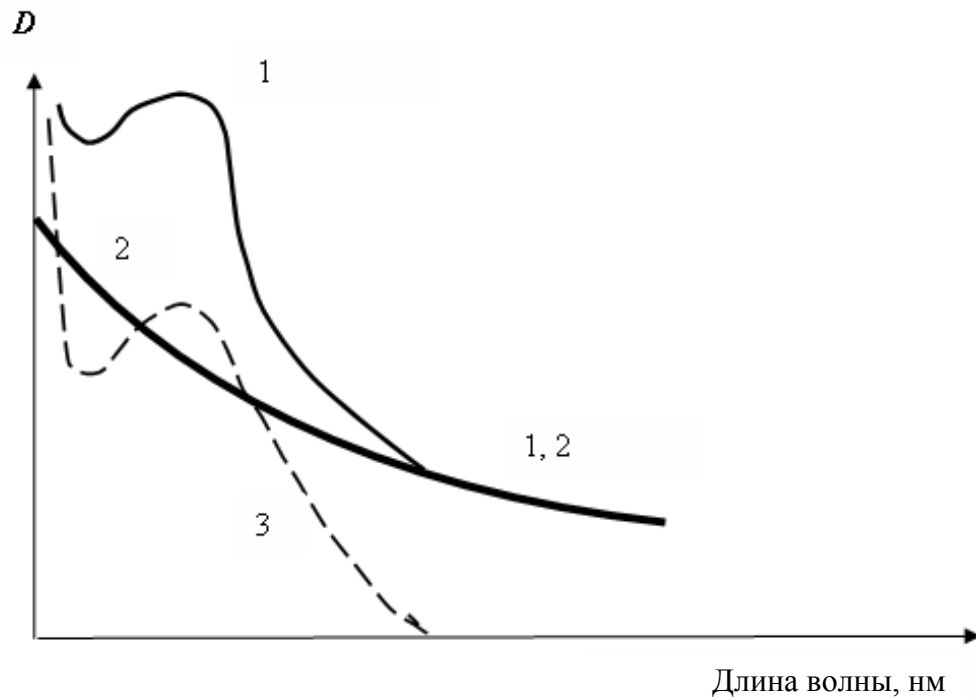


Рис. 1.34. Спектр поглощения раствора: 1 – экспериментальный (при  $>310$  нм – рассеяние); 2 – кажущееся поглощение из-за светорассеяния; 3 – истинное поглощение: кривая 1 минус кривая 2

Зависимость величины светорассеяния от длины волны имеет вид

$$D_{\text{расс}} = \frac{a}{\lambda^n}.$$

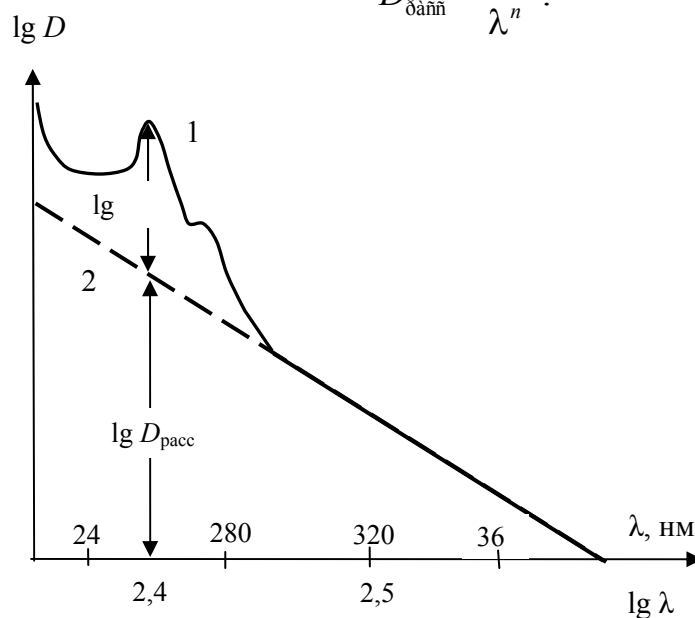


Рис. 1.35. Графический метод введения поправок на светорассеяние

$D_{\text{расс}}$  найдем при каждой длине волны, подставив  $a$  и  $n$  в приведенную выше формулу, или методом линейной экстраполяции из области  $> 310$  нм, где  $D = D_{\text{расс}}$ . Далее для получения истинного поглощения  $D_{\text{ист}}$  из измеренной

кривой оптической плотности  $D$  вычитаем поглощение, вызванное светорассеянием  $D_{\text{расс}}$ , и строим истинный спектр поглощения  $D_{\text{ист}} = f(\lambda)$ .

#### 1.14. Основные оптические методы исследования биологических объектов: абсорбционная спектроскопия видимого и ультрафиолетового света, флуоресцентная спектроскопия, круговой дихроизм и дисперсия оптического вращения, ИК- и Раман-спектроскопия.

#### Качественный и количественный спектрофотометрический анализ

Спектроскопическими методами анализа называются методы, основанные на взаимодействии вещества (в данном случае – анализируемого образца) с электромагнитным излучением. Диапазон электромагнитного спектра простирается от наиболее длинноволнового излучения – радиоволн с длинами волн более 0,1 см – до наиболее высокоэнергетического  $\gamma$ -излучения с длинами волн порядка  $10^{-11}$  м (рис. 1.36).

Отдельные области электромагнитного спектра часто перекрываются. Область электромагнитного излучения, воспринимаемая человеческим глазом, весьма незначительна по сравнению со всем его диапазоном. С отдельными областями электромагнитного спектра связаны различные методы анализа. В табл. 1.5 приведен обзор этих методов во взаимосвязи с соответствующими спектральными диапазонами и характером процессов, протекающих при взаимодействии излучения с веществом.

Характеристиками света как электромагнитной волны служат *длина волны*  $\lambda$  и *частота*  $\nu$ , которая представляет собой число колебаний электрического поля за одну секунду. Частота зависит только от природы источника излучения. Скорость же распространения электромагнитных волн, а, следовательно, и длина волны зависят также от свойств среды. Скорость распространения электромагнитного излучения в вакууме является фундаментальной физической постоянной, называемой скоростью света и равной  $2,997925 \cdot 10^8$  м/с. В воздухе скорость света уменьшается приблизительно на 0,03 %. Для практических целей можно принять значение скорости света равной  $3 \cdot 10^8$  м/с.

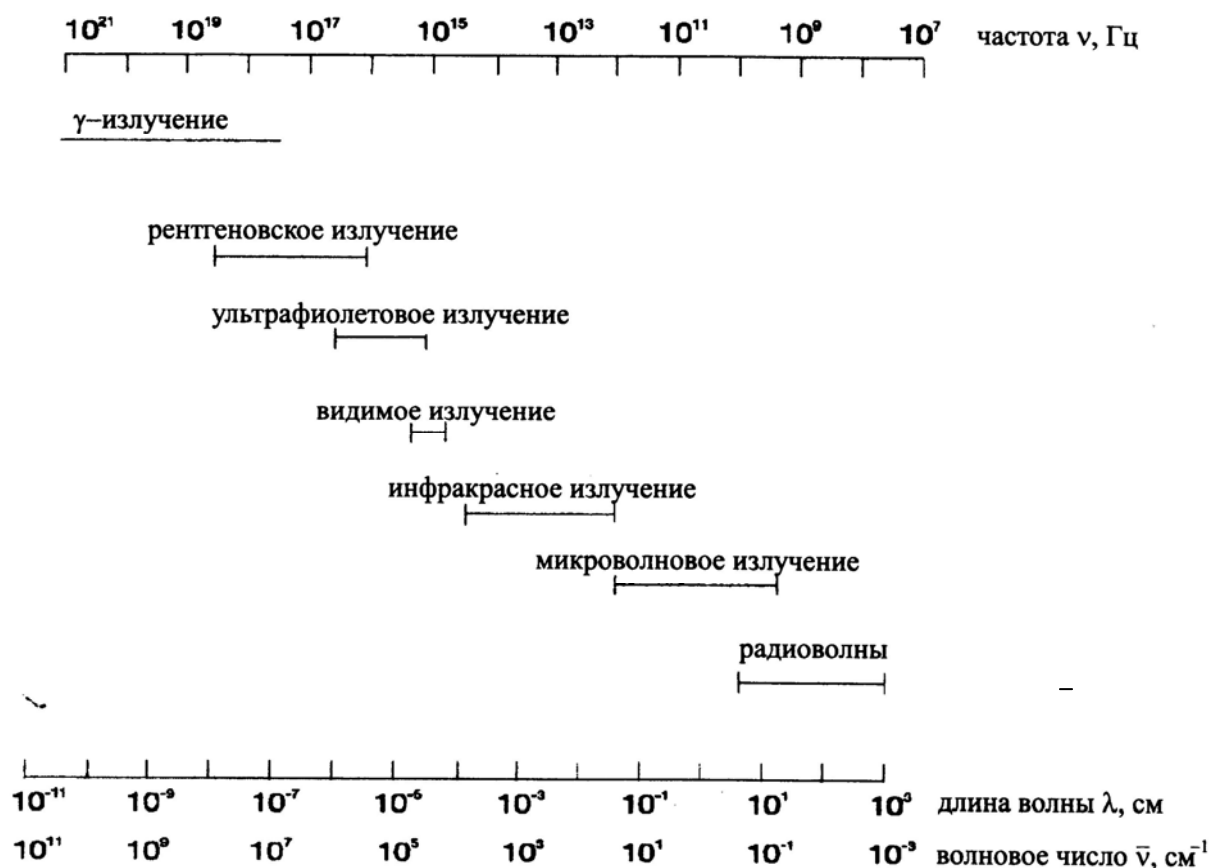


Рис. 1.36. Диапазон электромагнитного спектра

Прохождение света через оптически плотную среду (например воздух) сопровождается взаимодействием излучения с валентными электронами молекул вещества, в результате чего скорость распространения излучения уменьшается. Поскольку частота излучения при этом остается постоянной, длина волны изменяется. Пример, приведенный на [рис. 1.37](#), показывает, что при переходе видимого излучения из воздуха в стекло длина волны уменьшается приблизительно на 200 нм.

Мерой степени взаимодействия излучения с материалом среды служит показатель преломления  $n$ . Абсолютный показатель преломления равен отношению скорости света в вакууме  $c$  к скорости распространения излучения в данной среде  $v$ . Показатель преломления зависит от длины волны излучения.

Таблица 1.5

Взаимосвязь спектроскопических методов и областей электромагнитного спектра

Спектроскопические методы	Спектральная область	Изменяют свою энергию
Ядерно-физические	0,005–1,4 Å	Ядра
Рентгеновские	0,1–100 Å	Внутренние электроны
Вакуумная УФ-спектроскопия	10–180 нм	Валентные электроны
УФ-спектроскопия	180–400 нм	Валентные электроны
Спектроскопия в видимой области	400–780 нм	Валентные электроны
Ближняя инфракрасная спектроскопия	780–2500 нм	Молекулы (колебательная энергия)
Инфракрасная спектроскопия	4000–400 см <sup>-1</sup>	Молекулы (колебательная, вращательная энергия)
Микроволновая спектроскопия	0,75–3,75 мм	Молекулы (вращательная энергия)
Электронный парамагнитный резонанс	~ 3 см	Неспаренные электроны (в магнитном поле)
Ядерный магнитный резонанс	0,6–10 м	Ядерные спины (в магнитном поле)

Уменьшение скорости света при прохождении его через вещественную среду объясняется периодической *поляризацией* атомов или молекул среды. При этом часть энергии излучения поглощается средой и через приблизительно  $10^{-14}$  с высвобождается в том же количестве. Поэтому никакого результирующего поглощения энергии не наблюдается.

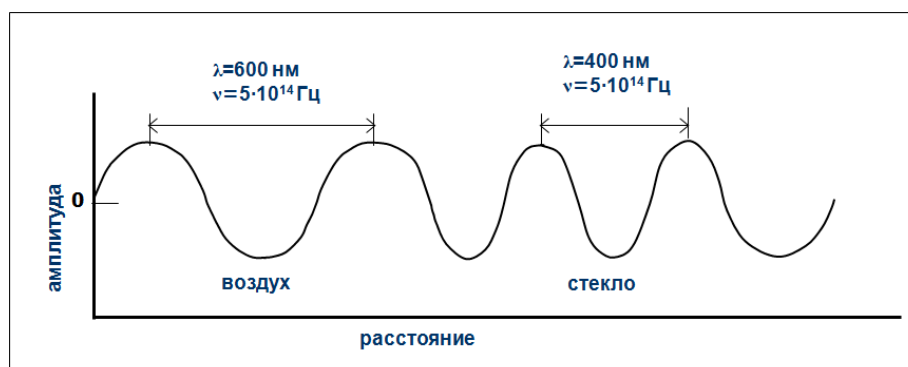


Рис. 1.37. Уменьшение длины волны при переходе видимого излучения из воздуха в стекло

Изменение показателя преломления при изменении длины волны (частоты) называется *дисперсией*. Если зависимость показателя преломления от длины волны линейна, то такая *дисперсия* называется *нормальной*. Резкое изменение показателя преломления в узком диапазоне длин волн называется



*аномальной дисперсией*. Материалы, обладающие как нормальной, так и аномальной дисперсией, используют для создания спектральных приборов. Линзы оптических приборов изготавливают из материалов с нормальной дисперсией, поскольку желательно, чтобы в этом случае показатель преломления в некотором спектральном диапазоне как можно меньше зависел от длины волны и был высоким. Материалы с аномальной дисперсией, сильно изменяющие показатель преломления при изменении длины волны, удобны для изготовления призм, разлагающих излучение в спектр.

Представление о корпускулярной природе электромагнитного излучения необходимо для описания процессов поглощения и испускания света. В ходе поглощения излучения, лежащего в определенной области спектра, отдельный атом, ион или молекула, взаимодействуя с фотоном, увеличивает свою энергию на величину, равную энергии фотона, и переходит из основного энергетического состояния в возбужденное. Согласно квантовой теории возможные энергетические состояния частицы дискретны и определяются природой частицы, ее окружением и физическим состоянием вещества. Процессы поглощения света отдельными атомами и молекулами протекают по-разному, о чем будет подробнее сказано при обсуждении соответствующих методов анализа.

*Испускание излучения* наблюдается тогда, когда частица, находящаяся в возбужденном состоянии, переходит в состояние с меньшей энергией. При этом избыток энергии высвобождается в виде фотона. Для перевода частицы в возбужденное состояние можно использовать поглощение излучения от внешнего источника, высокую температуру (в пламени или плазме), бомбардировку электронами или ионами и другие методы.

Первоначально спектроскопическими методами называли лишь те, которые основаны на взаимодействии вещества с электромагнитным излучением. Сейчас это понятие трактуют более широко, включая в него и методы с использованием электронных и ионных зондов, и методы на основе акустических явлений (такие как акустическая спектроскопия). К спектроскопическим относят и масс-спектрометрию, в основе которой лежит процесс разделения ионов.

Спектр является индивидуальной характеристикой вещества. Положение линий в спектре является основой качественного анализа, по интенсивности линий можно проводить количественный анализ содержания вещества с той или иной степенью точности.

Явления, протекающие на первых, биофизических, стадиях: поглощение света; перераспределение энергии в молекуле, находящейся в электронном возбужденном состоянии; межмолекулярный перенос энергии, образование первичных фотопродуктов (обычно свободнорадикальной природы) и превращение их в первые химически устойчивые соединения, — оказываются общими для всех фотобиологических процессов. Именно это

позволяет рассматривать первичные стадии фотобиологических процессов с единой точки зрения. По этой же причине сходны в общих чертах и основные методы исследования разных фотобиологических процессов.

Спектрофотометрия и люминесцентный анализ; импульсное облучение объектов в сочетании с быстродействующими методами регистрации оптических изменений в этих объектах; использование низких температур для изучения нестабильных промежуточных продуктов, применение вакуумной техники; регистрация свечения, сопровождающего рекомбинацию первичных, свободнорадикальных продуктов; использование метода электронного парамагнитного резонанса для идентификации этих продуктов – весь этот арсенал средств в равной мере применяется при исследовании первичных стадий как процессов фотосинтеза, так и действия ультрафиолета на белки и нуклеиновые кислоты, а также начальных этапов зрительного процесса.

#### 1.14.1. Методы атомной спектроскопии.

Методы атомной спектроскопии основаны на явлениях поглощения и испускания света свободными атомами, а также их люминесценции. При использовании излучения УФ- и видимой области спектра возбуждаются валентные, а рентгеновской – внутренние электроны атомов.

Изменение энергии валентных электронов свободных атомов – процессы, протекающие при высокой температуре, например в пламени или плазме. Впервые атомные спектры были использованы для получения химической информации в ходе астрономических исследований. Еще в начале XIX века Волластон (в 1802 году) и, независимо от него, Фраунгофер (в 1815 году) обнаружили в непрерывном спектре солнечного излучения темные линии. Объяснить происхождение этих линий, называемых фраунгоферовыми, удалось существенно позднее – лишь в 1859–1861 годах, когда Кирхгоф и Бунзен исследовали поведение паров солей в пламени. Основные выводы из их экспериментов состояли в следующем: наблюдаемые линии в спектре обусловлены наличием свободных атомов, а не их соединений; атомы, способные поглощать свет определенной длины волны, испускают свет той же длины волны – закон соответствия процессов испускания и поглощения; линии, наблюдаемые в спектрах, являются характеристичными для определенного элемента. Открытие Кирхгофа и Бунзена означало появление первого метода атомной спектроскопии, названного *спектральным анализом*. Первоначально он использовался лишь для *качественного* и *полуколичественного* анализов. Наблюдение атомных эмиссионных спектров позволило еще в XIX веке открыть ряд новых элементов – Rb и Cs (Кирхгоф, Бунзен), In (Райх), Ga (Лекок де Буабодран).

Начиная с 20-х годов XX века спектральный анализ превращается в метод *количественного анализа*. Следующим важным этапом явилось создание в 1960-е годы методов атомно-абсорбционной и атомно-

эмиссионной спектроскопии с индуктивной или емкостной связанной плазмой.

В основу *абсорбционного метода анализа* положен обобщенный закон Бугера – Ламберта – Бера, который базируется на двух положениях:

1. Относительное количество энергии светового потока, поглощенного средой, не зависит от интенсивности излучения. Каждый поглощающий слой одинаковой толщины поглощает равную долю проходящего через эти слои монохроматического светового потока.

2. Поглощение монохроматического потока световой энергии прямо пропорционально числу молекул поглощающего вещества.

### 1.14.2. УФ-видимая спектроскопия.

Этот метод основан на возбуждении валентных электронов молекулы. Из [табл. 1.5](#) видно, что два явления, связанные с возбуждением атомов и молекул: возбуждение вращательных и колебательных энергетических состояний молекул под действием инфракрасного излучения и возбуждение электронных состояний валентных электронов атомов под действием УФ- и видимого излучения. Для возбуждения валентных электронов молекул также необходимо излучение, лежащее в УФ-видимой области. Энергии такого излучения достаточно для того, чтобы одновременно возбудить колебательные и вращательные состояния молекул. Разделение УФ-видимой области спектра на диапазоны показано на [рис. 1.38](#).

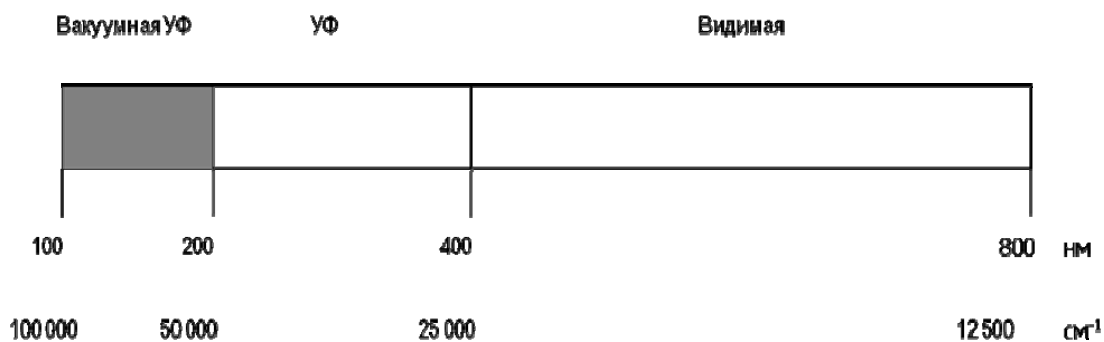


Рис. 1.38. УФ-видимая область электромагнитного спектра

При длинах волн ниже 190 нм начинает интенсивно поглощать кислород воздуха; работа в этом диапазоне возможна лишь в вакууме, поэтому диапазон 100–200 нм называют *вакуумной УФ-областью*. В дальнейшем мы его рассматривать не будем. Энергии УФ-излучения вакуумной области достаточно для того, чтобы выбить электрон из молекулы. На этом явлении основан метод *фотоэлектронной спектроскопии*.

Человеческий глаз восприимчив лишь к излучению видимого диапазона. Окраска различных предметов обусловлена тем, что они

поглощают видимое излучение некоторых длин волн и отражают (или пропускают, если речь о прозрачных телах) излучение при всех остальных длинах волн. Поэтому наблюдаемая окраска представляет собой цвет, дополнительный к цвету поглощаемого излучения ([табл. 1.6](#)).

Таблица 1.6

Дополнительные цвета к цветам поглощения

Поглощаемый цвет	Область поглощения, нм	Наблюдаемый цвет (цвет вещества)
Фиолетовый	380–450	Желто-зеленый
Синий	450–495	Желтый
Зеленый	495–570	От фиолетового до красно-фиолетового
Желтый	570–590	Синий
Оранжевый	590–620	Зеленовато-синий
Красный	620–750	Синевато-зеленый

Светопоглощение молекул в УФ-видимой области связано с возбуждением валентных электронов, находящихся в различных состояниях, а также с электронными переходами с переносом заряда (в комплексных соединениях).

*Качественный спектрофотометрический анализ* основывается на том, что каждое соединение имеет характерный для него спектр поглощения. Для идентификации вещества наиболее важны следующие параметры: число максимумов в спектре поглощения, положение (длина волны) каждого максимума; значение коэффициентов поглощения в каждом из максимумов (в единицах  $s$  или  $\epsilon$ ); отношение амплитуд максимумов, т. е. отношение коэффициентов поглощения в максимумах, если их несколько.

Сложность спектра поглощения зависит от того, какому числу электронных переходов между разными уровнями соответствует данный спектр. Считается, что каждый электронный переход дает полосу поглощения, которая на графике представлена кривой, близкой к гауссовой кривой нормального распределения.

*Количественный спектрофотометрический анализ* основан на применении закона Бугера – Ламберта – Бера. При количественном анализе можно одновременно определять концентрацию нескольких веществ, если спектры их поглощения различаются по форме.

Суммарный спектр поглощения нескольких веществ есть простая сумма спектров поглощения компонентов, так как при всех длинах волн оптические плотности компонентов суммируются.

Методы абсорбционной спектроскопии позволяют решать разнообразные задачи химии, биологии, биофизики и других наук: например, определять концентрацию вещества ([рис. 1.39](#)), исследовать химические реакции, идентификация веществ ([рис. 1.40](#)), переход спираль – клубок в двухцепочечной ДНК (денатурация, ренатурация), спектрофотометрическое титрование белков, определение некоторых особенностей конформации белков методом пертурбации растворителем и

дифференциальной (разностной) спектроскопии ([рис. 1.41](#)), денатурация белков, связывание белков с лигандами и т. п.

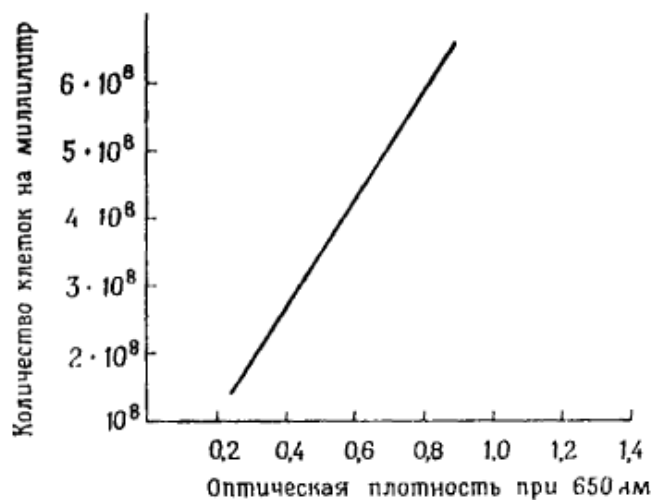


Рис. 1.39. Концентрация бактерий, определенная путем измерения оптической плотности

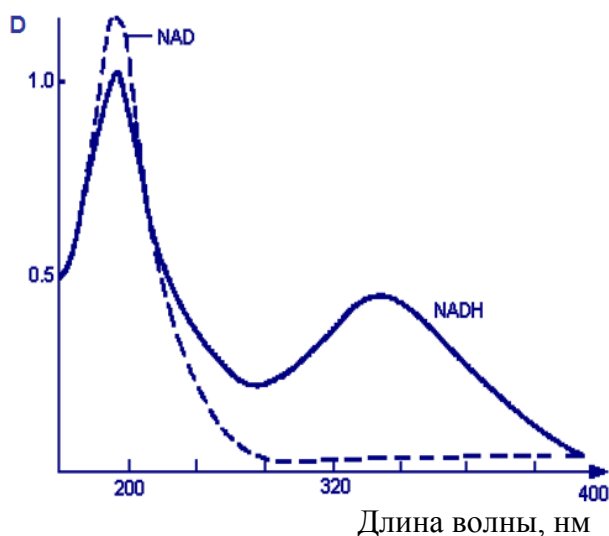


Рис. 1.40. Клинический анализ: определение концентраций *NAD* и *NADH*, а также наличие ферментов, которые катализируют эти превращения

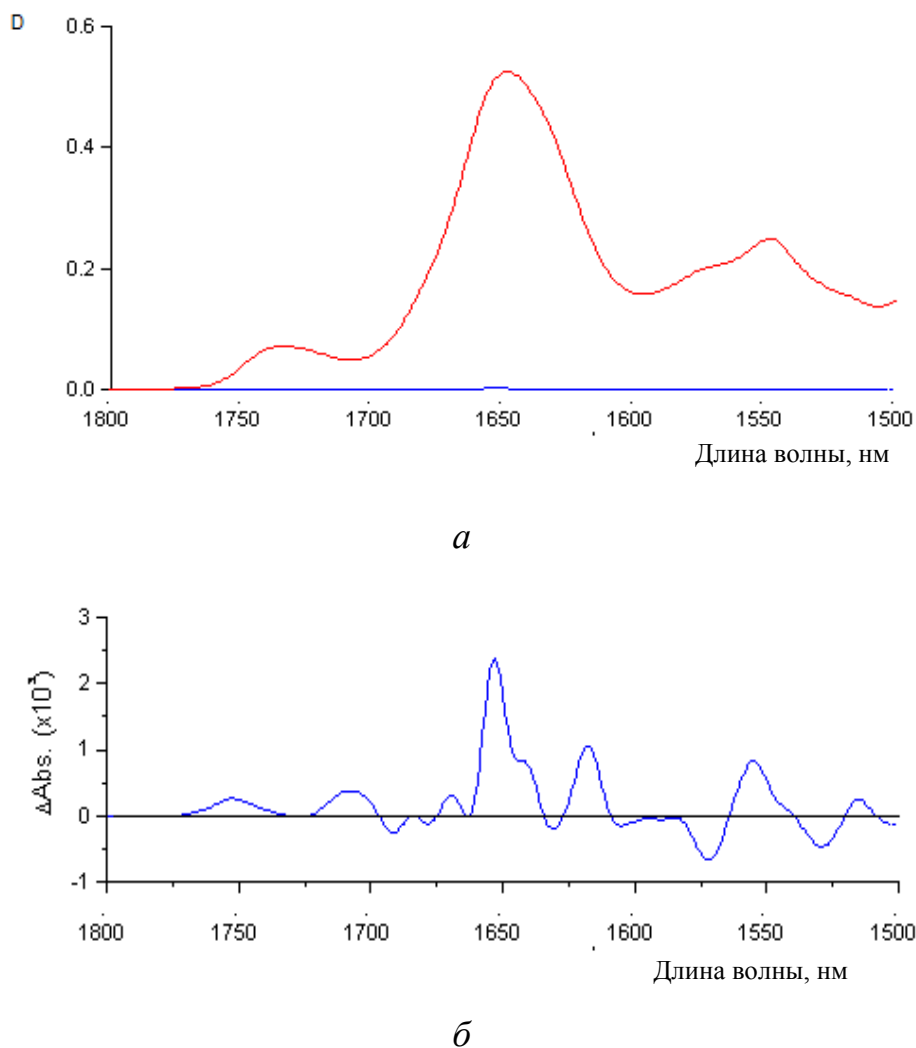


Рис. 1.41. Спектр поглощения (а) и дифференциальный спектр (б)  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азы

### 1.14.3.ИК- и Раман-спектроскопия.

*Инфракрасные спектры поглощения (ИКС)* так же, как и *спектры комбинационного рассеяния (СКР)*, используются для исследования вращательных молекулярных спектров, вращательной структуры электронных и колебательных спектров.

Главная трудность измерения ИК-спектров – нельзя использовать водные растворы образцов из-за сильного поглощения воды в ИК-области. Иногда используют  $\text{D}_2\text{O}$  или хлороформ. Хотя хлороформ растворяет многие полярные молекулы, но может вызвать и конформационные изменения, например, белковых макромолекул. Использование тонких сухих пленок – достаточно распространенный прием для изучения спектральных свойств макромолекул. Пленки обычно растягивают, для того чтобы все молекулы были ориентированы в одном и том же направлении, и измерения возможно



было проводить в поляризованном свете для определения ориентации отдельных групп по отношению к оси молекулы.

Эти методы позволяют по найденным из опыта значениям моментов инерции молекул, которые получаются из значений вращательных постоянных, находить с большой точностью (для более простых молекул, например  $\text{H}_2\text{O}$ ) параметры равновесной конфигурации молекулы – длины связей и валентные углы. Для увеличения числа определяемых параметров исследуют ИК-спектры изотопических молекул (в частности, в которых водород заменен дейтерием), имеющих одинаковые параметры равновесных конфигураций, но различные моменты инерции.

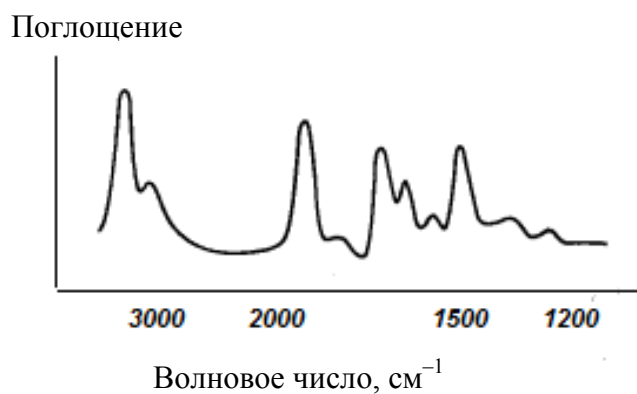
Каждая полоса в ИК-спектре так же, как и обычный спектр, может быть охарактеризована частотой максимума поглощения, шириной полосы на половине высоты, максимальной оптической плотностью и формой полосы. Для ориентированных пленок измеряется *дихроичное отношение*  $R$  – отношение площадей, полученных, когда электрический вектор световой волны параллелен и перпендикулярен оси молекулы. На примере простых молекул точно установлено, какой группе и какому типу колебаний соответствует каждая полоса в спектре. Колебательные молекулярные спектры позволяют находить *характеристические частоты колебаний*, соответствующие определенным типам химических связей в молекуле (например, простых двойных и тройных связей  $\text{C}=\text{C}$ , связей  $\text{C}-\text{H}$ ,  $\text{N}-\text{H}$ ,  $\text{O}-\text{H}$  для органических молекул), различных групп атомов (например,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{NH}_2$ ), определять пространственную структуру молекул, различать *цис*- и *транс*-изомеры.

В случае простых соединений ИК-спектры отличаются от спектров в видимом и ультрафиолетовом свете тем, что они состоят из довольно узких линий (рис. 1.42, а). В макромолекулах число связей и количество конформаций очень велики, поэтому каждая полоса смещается в зависимости от положения соответствующей группы в молекуле и полосы перекрываются, результатом чего является содержание в спектре нескольких относительно широких полос (рис. 1.42, б).

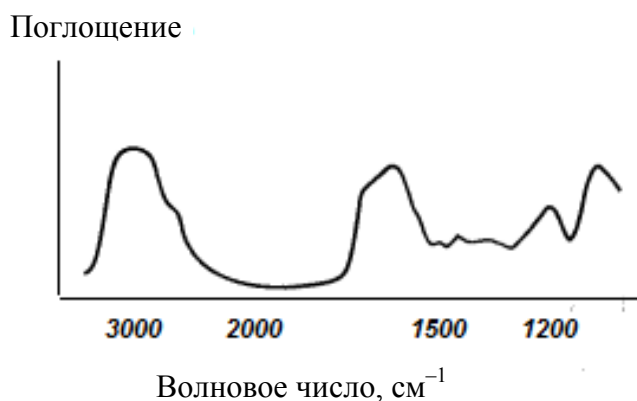
Области применения ИК-спектроскопии к изучению биологических объектов очень обширные: определение относительного содержания вторичных структур и беспорядочного клубка в белках, идентификация обменивающегося атома водорода, идентификация таутомерных форм по появлению новых полос, изучение взаимодействия между небольшими молекулами, например рибофлавина и аденина, связывание белка с лимандами, титрование карбоксильных групп белка.

Методы комбинационного рассеяния (Раман-спектроскопия) основаны на эффекте неупругого рассеяния, в результате которого происходит изменение частоты рассеянного света. Причиной изменения частоты является переход на более высокий колебательный уровень либо добавление к электромагнитной энергии световой волны колебательной энергии молекулы

в стороны уменьшения или увеличения частоты соответственно. Типичный КР-спектр приведен на [рис. 1.43](#).



*a*



*б*

Рис. 1.42. ИК-спектры стеариновой кислоты (*a*) и ДНК (*б*)

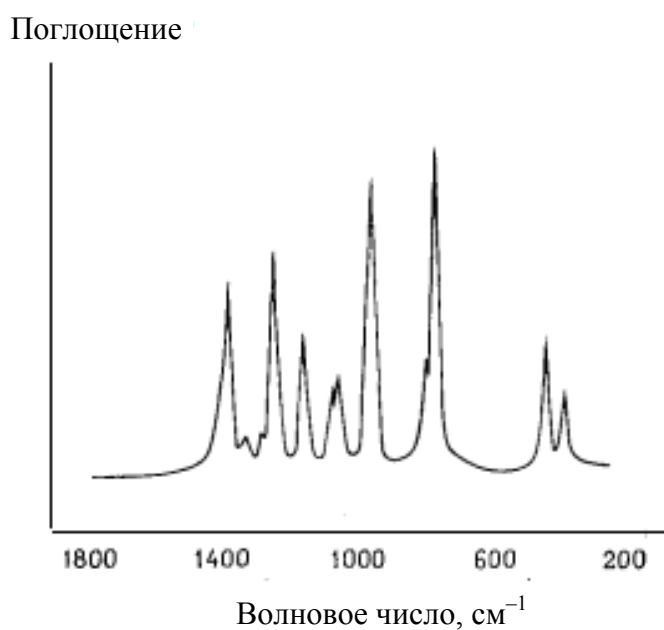


Рис. 1.43. КР-спектр диоксана

Преимущество этого метода перед ИК-спектроскопией состоит в том, что он позволяет проводить измерения в водных растворах. Методы комбинационного рассеяния распространены не так широко, как методы ИК-спектроскопии. Примерами применения КР-спектроскопии могут служить следующие: доказательство цвиттер-ионного строения аминокислот, определение числа S–S-связей в белках, определение числа спаренных и неспаренных оснований в РНК и др.

#### 1.14.4. Флуоресцентная спектроскопия.

Этот метод оптической спектроскопии подразделяется на *методы флуоресцентной, фосфоресцентной и хемилюминесцентной спектроскопии*. Основное различие этих методов состоит в продолжительности свечения. Первые два метода основаны на измерении интенсивности излучения, испускаемого в результате поглощения фотонов (*фотолуминесценция*). Хемилюминесценция – это процесс испускания света молекулами, возбужденными в ходе химической реакции. Такими молекулами являются не частицы определяемого компонента сами по себе, а продукты их химических превращений (например окисления).

Явление флуоресценции можно наблюдать как для атомов, так и для молекул. Рассмотрим процесс возбуждения валентных электронов молекулы. Каждое энергетическое состояние валентных электронов дополнительно характеризуется набором уровней колебательной энергии. Взаимное расположение электронных и колебательных уровней можно представить графически в виде диаграммы Яблонского ([рис. 1.44](#)). На ней электронные уровни изображены более жирными, а колебательные (с колебательным квантовым числом  $\nu$ ) – более тонкими линиями. Расстояние между колебательными уровнями уменьшается с ростом колебательного квантового числа. Спектр излучения флуоресценции многих веществ носит избирательный характер.

Как и в случае спектров поглощения, избирательность обусловлена структурой и составом излучающего вещества. Спектры излучения растворов при флуоресцентных измерениях состоят, как правило, из широкой полосы с максимумом при некоторой длине волны. Кроме веществ, дающих широкие полосы излучения, встречаются вещества с хорошо выраженной колебательной структурой спектра.

Фосфоресценция обусловлена переходом из триплетного состояния. Как следует из диаграммы Яблонского ([рис. 1.44](#)), для осуществления фосфоресценции необходима предварительная интеркомбинационная конверсия. Длительность процесса фосфоресценции составляет от  $10^{-3}$  до 10 с. Особенно длительное свечение наблюдается в случае биолуминесценции.

В люминесцентном методе анализа зависимость аналитического сигнала (интенсивность люминесценции) от концентрации вещества сложнее, чем в абсорбционном (закон Ламберта – Бера). Она зависит от квантового выхода люминесценции  $Q$  – отношения числа испущенных фотонов к числу поглощенных фотонов. Для очень разбавленных растворов зависимость между интенсивностью люминесценции и концентрацией  $c$  приближенно выражается как  $I = QI_0\epsilon dc$ , где  $I_0$  – интенсивность внешнего источника света, а  $\epsilon$ ,  $d$  и  $c$  имеют те же значения, что и в формуле выражения закона Ламберта – Бера.

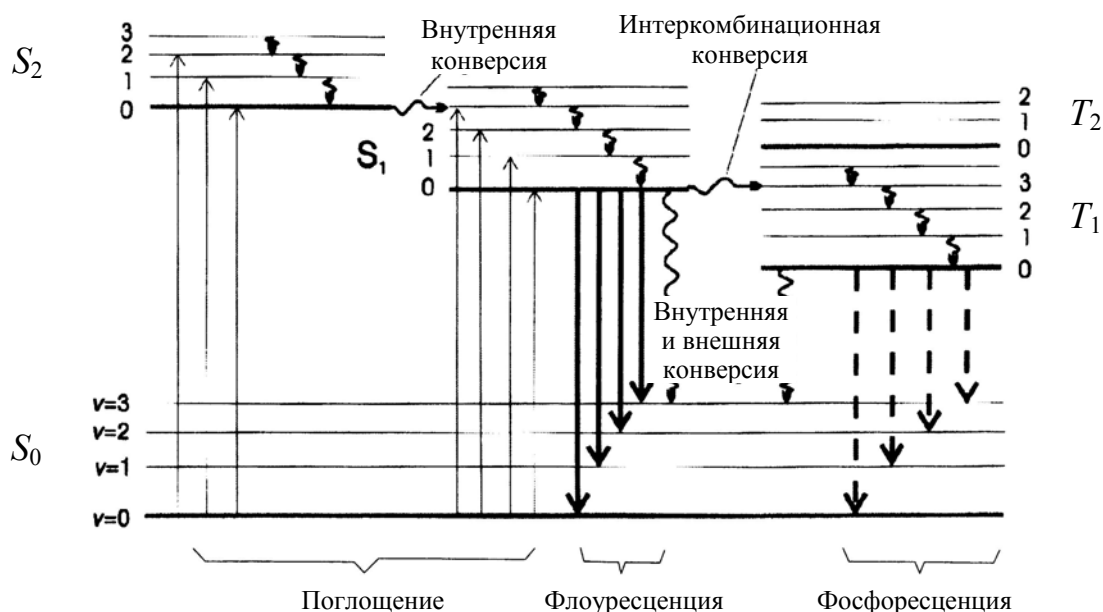


Рис. 1.44. Диаграмма Яблонского

В отличие от оптической плотности интенсивность люминесценции прямо пропорциональна интенсивности источника света. Чем выше интенсивность источника, тем больше и аналитический сигнал. По сравнению с методом абсорбционной спектроскопии люминесцентный метод характеризуется более широким динамическим диапазоном концентраций, достигающим трех порядков (от  $10^{-7}$  до  $10^{-4}$  М).

Хемилюминесцентное излучение наблюдается тогда, когда в ходе химической реакции образуется возбужденная молекула, способная люминесцировать при переходе в основное состояние. Это явление наблюдается и в биологических системах и называется в этих случаях биолюминесценцией. Для выполнения анализа требуется лишь измерить интенсивность возникающего люминесцентного излучения с помощью ФЭУ.

Наиболее эффективно хемилюминесцентные вещества используются в качестве индикаторов. При титровании окрашенных и мутных сред их

преимущество по сравнению с флуоресцентными индикаторами заключается в том, что нет необходимости прибегать к формированию светового потока возбуждения.

В аналитической практике нашли наибольшее применение такие хемилюминесцентные индикаторы, как люминол, люцегитин, лафин и силаксен. Частный случай хемилюминесценции – биолюминесценция, имеющая биологическую природу свечения. При биолюминесценции выделение световой энергии излучения происходит в результате окислительного процесса, катализируемого ферментами – люциферазами. Эти ферменты получают из биологических систем. Наиболее широко известны два типа люциферазы: светлячковая и бактериальная. Поскольку биологические катализаторы – ферменты, – как правило, чрезвычайно избирательны, то биолюминесцентные методы очень специфичны.

#### 1.14.5. Круговой дихроизм и дисперсия оптического вращения.

С помощью методов кругового дихроизма (КД) и дисперсии оптического вращения (ДОВ) измеряют в зависимости от длины волны способность оптически активного хромофора вращать плоско поляризованный свет (ДОВ) и по-разному поглощать поляризованный по кругу вправо и влево свет (КД). В основе методов кругового дихроизма и дисперсии оптического вращения лежат одни и те же физические законы: взаимодействия поляризованного света с оптически активными молекулами. Оптически активные центры молекул содержатся в большинстве биологических молекул. ДОВ и КД широко используются, например, для изучения конформации макромолекул, их комплексов в растворах, а также взаимодействия макромолекул.

#### 1.15. Аппаратура для спектрометрии в УФ-видимой области, ИК- и Раман-спектроскопии

Измерение спектров поглощения растворов, суспензий и даже целых тканей осуществляется с помощью спектрофотометров, которые можно разделить на однолучевые и двухлучевые. Принципиальная схема оптического спектрометра представлена на [рис. 1.45](#).

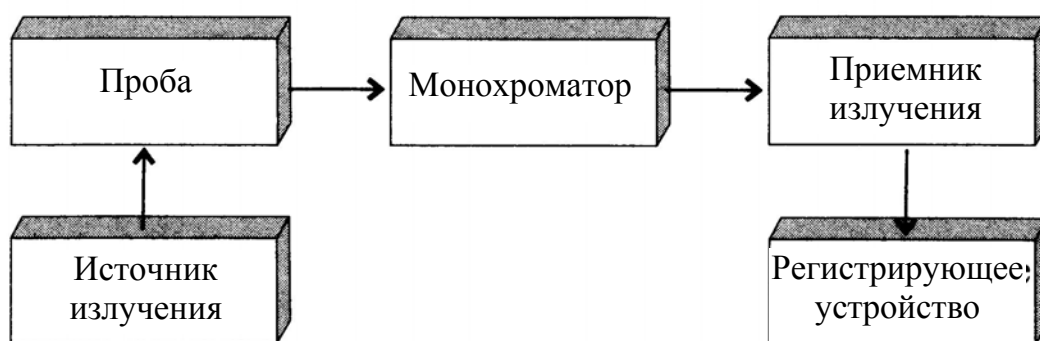


Рис. 1.45. Принципиальная схема оптического спектрометра

Принципиальная схема спектрометра включает источник излучения, отделение для пробы, диспергирующее устройство или монохроматор для разложения светового потока и систему детектирования и регистрации. Для некоторых спектроскопических методов требуется весьма специфическое оборудование. Для оптической же спектроскопии аппаратура почти всегда состоит из одного и того же ограниченного набора компонентов, единого для всех методов.

Под оптической спектроскопией первоначально понимали методы, использующие излучение лишь видимого диапазона. Сейчас в это понятие включают также методы спектроскопии в ультрафиолетовой и инфракрасной областях.

Первым компонентом спектрометра является источник излучения. Обычно он помещается вне пробы. Однако, например, в методе атомно-эмиссионной спектроскопии анализируемая проба сама по себе является одновременно источником излучения. Свет от источника (чаще используются ксеноновые лампы, дающие сплошной спектр излучения в видимом и ультрафиолетовой областях) проходит через монохроматор (устройство для выделения определенного диапазона длин волн). Монохроматический пучок света проходит через кювету, и его интенсивность измеряют детектором света – фотоэлектронным умножителем (ФЭУ) (рис. 1.46). Фототок подается на вход усилителя, затем сигнал преобразуется в специальном электронном блоке и подается на компьютер.

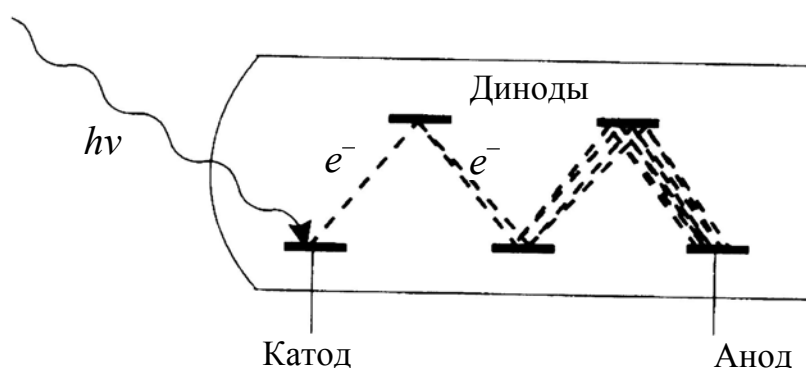


Рис. 1.46. Схема фотоэлектронного умножителя



В табл. 1.7 приведены важнейшие источники излучения, используемые в отдельных диапазонах оптической спектроскопии. Общими требованиями ко всем источникам являются высокая интенсивность и стабильность излучения. Самыми общеизвестными являются источники непрерывного излучения, которые широко применяются и в быту (например лампы накаливания). В атомно-абсорбционной спектроскопии для регистрации весьма узких атомных линий необходимы источники линейчатого спектра.

Таблица 1.7

Источники излучения для оптической спектроскопии

Область спектра	Источник излучения
-----------------	--------------------

<i>Непрерывный спектр</i>	
Вакуумная УФ	Аргоновые, ксеноновые лампы
УФ	Ксеноновые, водородные, дейтериевые лампы
Видимая	Вольфрамовые, галогеновые лампы
Ближняя ИК	Вольфрамовые лампы, штифты Нернста, нихромовые излучатели, глобары
ИК	Штифты Нернста ( $ZrO_2 + Y_2O_3$ ), нихромовые излучатели ( $Ni + Cr$ ), глобары ( $SiC$ )
<i>Полосатый спектр</i>	
УФ-видимая	Светодиоды
<i>Линейчатый спектр</i>	
УФ-видимая	Лампы с полым катодом, безэлектродные разрядные лампы

В современных вариантах спектрофотометрии используют оптоволоконные системы передачи света, в частности лазерного излучения (рис. 1.47). Этот дает возможность проводить анализ тех образцов, которые невозможно поместить в кювету, например микрообъемов жидкостей или участков тканей *in vivo*.



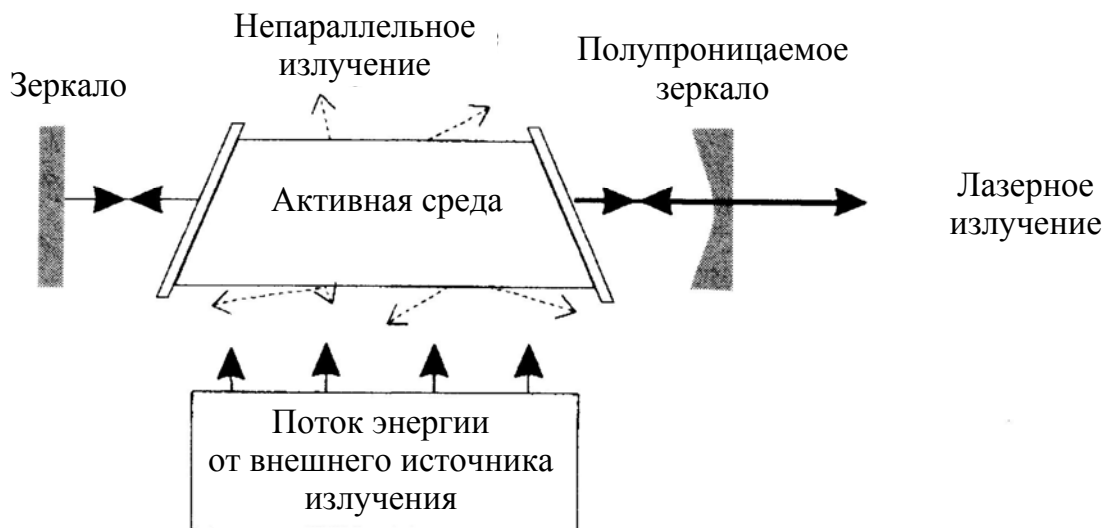


Рис. 1.47. Принципиальная схема лазера

С изобретением в 1960 г. лазеров спектроскопические методы анализа получили еще один источник излучения, отличающийся особенно высокой интенсивностью, узостью светового потока (сотые доли микрометра), высокой монохроматичностью (0,01 нм и менее) и когерентностью излучения, т. е. совпадением по направлению и фазе всех испускаемых волн. Первые модели лазеров излучали лишь при одной определенной длине волны. Сейчас разработаны и лазеры с перестраиваемой частотой, например, лазеры на красителях для видимой части спектра.

Основной частью лазера является активная среда (рабочее тело). Ею может быть кристалл (например рубин), полупроводниковый материал, раствор красителя или газ – гелий, неон, аргон (см. [рис. 1.46](#)). Иногда рабочее тело лазера необходимо активировать электрическим разрядом, например, в случае газовых лазеров. В других случаях требуется подвод энергии к лазеру от внешнего источника излучения, например, импульсной лампы.

Принцип действия лазера основан на резонансе излучения, отражаемого зеркалами и многократно пробегающего через активную среду. При каждом его проходе испускаются дополнительные фотоны, и лазерное излучение многократно усиливается. При этом световой пучок дополнительно фокусируется. Поскольку одно из зеркал является полупроницаемым, лазерное излучение выходит наружу.

В аналитической химии лазеры используются как источники излучения для спектроскопии высокого разрешения и исследования быстрых процессов. Их можно использовать для непосредственного определения следов примесей в атмосфере, в приборах для комбинационного рассеяния и ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием.

В спектроскопическом анализе, как правило, стараются работать с монохроматичным или, по крайней мере, как можно более узкополосным излучением. Как в абсорбционной, так и в эмиссионной спектроскопии применение монохроматического излучения улучшает селективность, а в

абсорбционной, кроме того, и увеличивает чувствительность. Использование монохроматического излучения в качестве источника возбуждения часто бывает необходимым условием получения линейных зависимостей сигнал в широком динамическом концентрация-диапазоне. Для выделения узкополосных световых потоков используют светофильтры или монохроматоры.

*Светофильтры* делятся на *абсорбционные* и *интерференционные*. Они различаются с точки зрения степени пропускания (интенсивности прошедшего света) и спектральной ширины пропускания. Эффективная спектральная ширина пропускания типичного интерференционного светофильтра составляет около 10 нм, а абсорбционного – около 50 нм. Абсорбционные светофильтры, помимо большей спектральной ширины, обычно обладают и значительно меньшей степенью пропускания по сравнению с интерференционными. Для решения многих практических задач спектроскопии светофильтры применяются до сих пор, несмотря на их существенно меньшие возможности по сравнению с монохроматорами. Они относительно недороги и очень удобны в использовании в специализированной и миниатюризированной аппаратуре.

*Монохроматоры* состоят из следующих частей:

- входная щель, вырезающая узкий прямоугольный пучок из падающего светового потока;
- система линз или вогнутых зеркал для получения параллельного светового потока;
- диспергирующий элемент – призма или дифракционная решетка;
- фокусирующее устройство для фокусирования потока на выходной щели;
- выходная щель, вырезающая из выходного светового потока пучок лучей желаемой спектральной ширины.

Часто в монохроматорах используют и вспомогательные светофильтры для отсека паразитных световых потоков, приходящих из окружающей среды. Типичные схемы призмных и решетчатых монохроматоров приведены на [рис. 1.48](#).

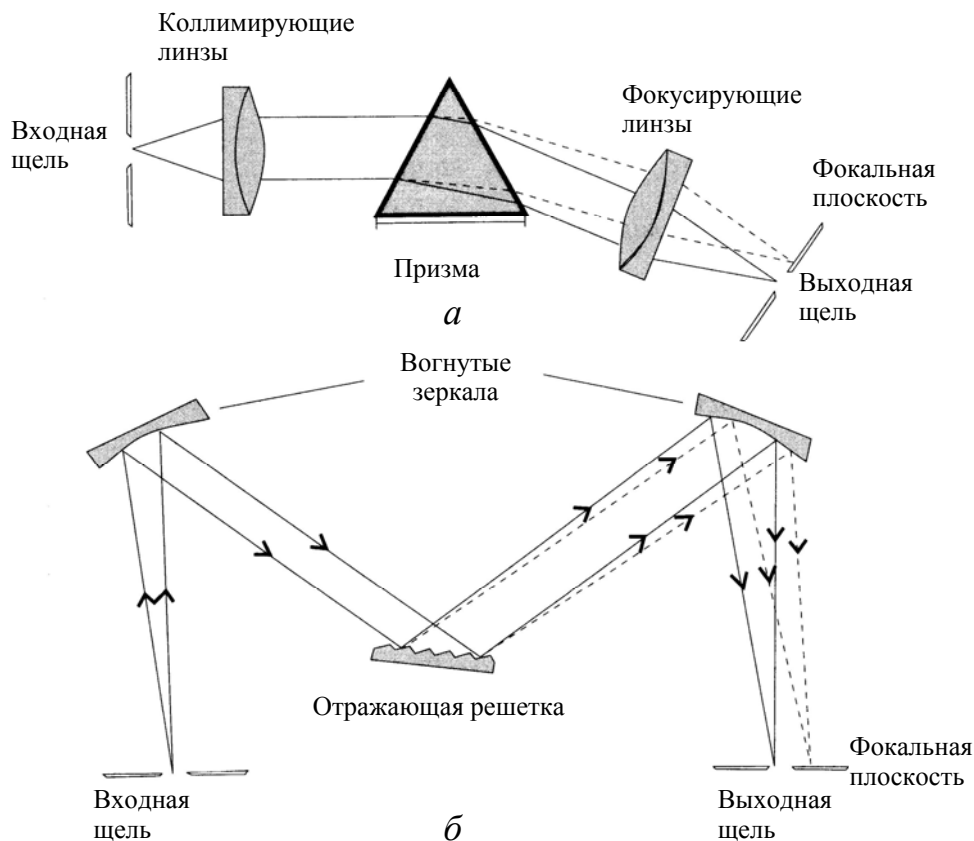


Рис. 1.48. Схемы двух типов монохроматоров:  
а – призмный; б – решеточный

В монохроматоре любой конструкции световой поток попадает сначала на входную щель. Затем его превращают в параллельный с помощью системы линз. Ранее основным типом диспергирующих элементов монохроматоров были призмы. Сейчас большинство спектрометров оснащены решеточными монохроматорами, причем отражательные дифракционные решетки преобладают над прозрачными (работающими на пропускание). После выхода из диспергирующего устройства лучи различных длин волн фокусируют в фокальной плоскости с помощью линз или зеркал. Выходная щель, находящаяся в фокальной плоскости, вырезает световой поток малой спектральной ширины, длина волны которого определяется положением диспергирующего элемента.

*Дифракционные решетки* дешевле призм. По сравнению с призмами равного размера они обладают лучшим спектральным разрешением, а дисперсия излучения одинакова во всем диапазоне длин волн. В то же время *призмы* обладают большей светосилой. Показатель преломления материала призмы нелинейно зависит от длины волны. Вследствие этого дисперсия призм неодинакова в различных спектральных областях. В области коротких волн она выше, чем в области длинных. Для кварцевых призм дисперсия в видимой области ниже, чем для стеклянных. Для любого оптического

материала наивысшая дисперсия, а, следовательно, и разрешающая способность достигаются вблизи края полосы поглощения.

Традиционно дифракционные решетки производят механическим способом, процарапывая борозды на поверхности полированного твердого материала алмазной иглой. Получаемые таким, весьма трудоемким, способом оригиналы затем тиражируют с помощью специальных устройств.

Отражательные решетки для работы в УФ- и видимой областях содержат до 1200 штрихов на миллиметр. Решетки для работы в ИК-области имеют 100–200 штрихов на миллиметр. Для обеспечения особенно высокой разрешающей способности (что необходимо, например, в атомно-абсорбционной спектроскопии) требуются решетки с еще большим числом штрихов на миллиметр.

### 1.15.1. Дисперсия и разрешающая способность монохроматора.

Возможность разделения отдельных спектральных полос зависит от дисперсии монохроматора. В качестве характеристики дисперсии используют линейную ( $D$ ) и, особенно часто, обратную линейную дисперсии.

В отличие от спектров, получаемых с помощью призм, при использовании решеток спектр получается неоднозначным из-за возможного перекрывания линий разных порядков отражения. Обычно измерения производят в первом порядке отражения, так как с ростом порядка отражения уменьшается интенсивность линий. Используя решетки со специальным (пилообразным) профилем бороздок, можно сконцентрировать основную часть излучения в некотором спектральном диапазоне данного порядка в определенной пространственной области. Решетки такого типа называются эшелеттами. Современные технологии производства дифракционных решеток основаны на использовании лазеров, позволяющих оптическим способом наносить бороздки на плоские или вогнутые поверхности. Изготовленные таким способом *голографические решетки* являются высокоточными. Они содержат до 6000 штрихов на миллиметр. Их используют, в частности, в спектрометрах с диодными детекторами (в том числе массивами диодов) ([рис. 1.49](#)).

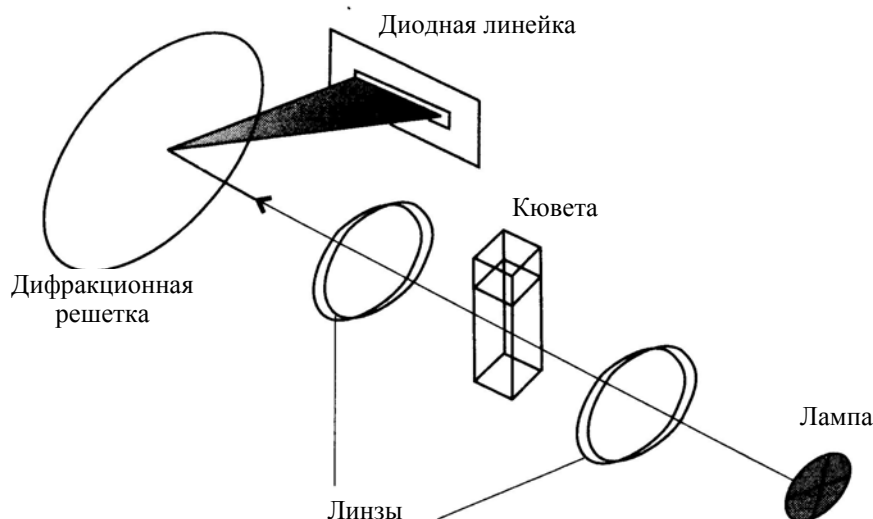


Рис. 1.49. Спектрофотометр с диодной линейкой

В оптических спектрометрах пробы помещают в специальные сосуды. Для жидких проб используют кюветы, изготовленные из кварца (для исследований в УФ-области), стекла (для видимой и ближней ИК-области) или солей NaCl (для ИК-области спектра). Из этих же материалов изготавливают призмы, линзы и оптические окошки. Более подробно оптические материалы будут рассмотрены применительно к конкретным методам. Твердые образцы исследуют или непосредственно, или в виде таблеток, спрессованных из порошкообразного материала и подходящего наполнителя.

Для детектирования излучения в оптической области используют приемники, действие которых основано на фотоэлектрических или термоэлектрических явлениях. Явление *внешнего фотоэффекта* лежит в основе действия счетчиков фотонов, таких как фотоэлементы или фотоэлектронные умножители. Фотоэлемент содержит катод, из которого фотон при падении на него выбивает электрон. Вследствие этого в вакуумном пространстве между катодом и анодом возникает электрический ток. Коэффициент полезного действия (квантовый выход) такого фотоэлектрического преобразователя не очень высок. Материалом катодов обычно служит сплав щелочных металлов. Например, катоды из сплава K/Cs очень чувствительны к излучению в УФ-видимой области вплоть до 600 нм. В более длинноволновой области применяют другие многокомпонентные материалы – Na/K/Cs/Sb или Ag/O/Cs. Высокой и практически постоянной чувствительностью в широком спектральном диапазоне обладают фотокатоды на основе Ga/As.

Фотоприемниками на основе *внутреннего фотоэффекта* являются полупроводниковые фотоэлементы и фотодиоды. Для полупроводниковых детекторов описанного типа большинство характеристик (чувствительность, рабочий диапазон, отношение сигнал – шум) хуже, чем для ФЭУ. С этой



точки зрения представляется очень перспективным использование в спектро스코пии светочувствительных полупроводниковых приборов нового типа – так называемых приборов с переносом заряда (ППЗ). Регистрация *инфракрасного излучения* представляет собой более серьезную проблему, чем регистрация видимого или УФ-излучения. Интенсивность источников излучения и потоки энергии в ИК-области ниже, чем в УФ или видимой. Фотоэлектрические детекторы здесь неприменимы, поскольку в ИК-области фотоэффект не наблюдается. Они работают по принципу термодетекторов. Их характеристики намного хуже, чем у ФЭУ.

Определение содержания вещества методом молекулярной абсорбции (спектрофотометрии) можно проводить как непосредственно, так и с использованием специальных фотометрических реагентов. Пример спектрофотометра, изготовленного на основе дифракционной решетки, приведен на [рис. 1.50](#).



Рис. 1.50. Универсальный сканирующий спектрофотометр GENESYS 10S (США, 2004)

В УФ-области можно непосредственно определять ароматические соединения, например содержание бензола в воде. В видимой области можно определять различные красители или окрашенные неорганические ионы. Возможно проводить и титрование этими ионами с фотометрической индикацией.

Инфракрасные спектрофотометры в принципе не отличаются от спектрофотометров, работающих в ультрафиолетовом или видимом свете. Источником излучения является тело, нагретое до 1500–1800 К для выделения длин волн используется монохроматор, но в качестве детектора применяют термопара. Характеристики термодетекторов намного хуже, чем у ФЭУ.

## 1.16. Аппаратура в люминесцентном анализе

Прибор для измерения интенсивности флуоресценции отличается от абсорбционного спектрофотометра тем, что измерение происходит под углом (обычно прямым) к падающему лучу света. Поэтому кюветы должны быть прозрачными во всех направлениях. Один из основных способов возбуждения люминесценции состоит в использовании квантов света с более короткой, чем у люминесцентного излучения, длиной волны. При этом существуют различные способы возбуждения люминесценции микрообъекта для последующего микроскопического изучения его.

Высококачественный флуоресцентный спектрометр включает в себя два монохроматора ([рис. 1.51](#)). Это позволяет независимо регистрировать и спектр возбуждения, и спектр флуоресценции. Основным достоинством флуоресцентных методов анализа по сравнению с другими фотометрическими методами является их высокая чувствительность. Пример спектрофлуориметра приведен на [рис. 1.52](#).

Измерение поляризации люминесценции получило широкое применение, поскольку оно позволяет изучать вращательную подвижность частиц в данной среде под действием тепловых соударений с окружающими молекулами. Возбуждение плоскополяризованным светом максимально эффективно для тех молекул, вектор электронного перехода в которых находится в плоскости поляризации возбуждающего света, т. е. параллелен электрическому вектору электромагнитных колебаний. Флуоресценция таких молекул будет сильно поляризована.

Флуоресценция низкомолекулярных соединений, растворенных в воде или спирте, всегда полностью деполяризована. Деполяризация флуоресценции происходит тогда, когда в результате вращения молекулы вектор электронного перехода меняет свое направление за время от момента возбуждения до момента испускания молекулой кванта флуоресценции (т. е. за время жизни молекулы в возбужденном состоянии). Но флуоресценция поляризована при растворении тех же веществ в средах с высокой вязкостью, например в глицерине. На этом явлении основан способ определения вязкости среды, окружающей флуоресцирующие молекулы, например, вязкость липидного слоя мембран, в котором растворен флуоресцирующий краситель (флуоресцентный зонд).



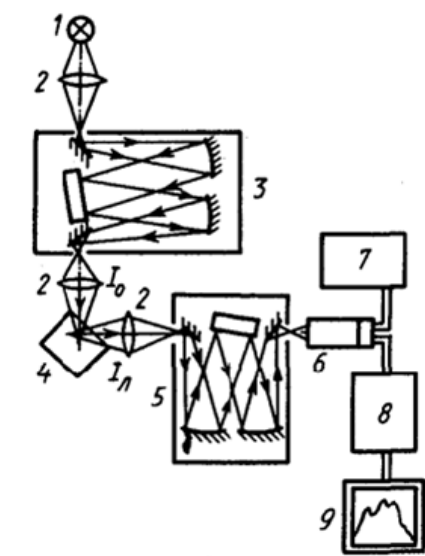


Рис. 1.51. Схема спектрофлуориметра: 1 – лампа; 2 – линзы; 3 и 5 – монохроматоры; 4 – кювета с образцом; 6 – ФЭУ; 7 – блок питания ФЭУ; 8 – усилитель; 9 – самописец;  $I_0$  – возбуждающий свет;  $I_n$  – люминесценция образца



Рис. 1.52. Сканирующий спектрометр *Aminco®Bowman Series 2* (Thermo Spectronic, USA)

Для регистрации фосфоресценции необходимы еще два дополнительных устройства. Одно из них – механический или электронный прерыватель, позволяющий облучать пробу очень короткими импульсами и

тем самым отделить длительное фосфоресцентное свечение от кратковременного флуоресцентного. Кроме того, фосфоресценция обычно наблюдается лишь при очень низких температурах (при повышении температуры происходят интенсивные процессы дезактивации триплетного состояния вследствие столкновений между молекулами). Поэтому фосфоресцентный спектрометр, как правило, включает в себя и устройство для охлаждения пробы до температуры жидкого азота.

Особое место в люминесцентном анализе занимают *хемилюминесцентные методы анализа*. Обычно это реакции окисления, в ходе которых происходит возбуждение молекул продуктов реакции и выделение световой энергии (лучистая дезактивация) при возвращении их в основное состояние.

Наиболее эффективно хемилюминесцентные вещества используются в качестве индикаторов. При титровании окрашенных и мутных сред их преимущество по сравнению с флуоресцентными индикаторами заключается в том, что нет необходимости прибегать к формированию светового потока возбуждения.

Как и большинство фотометрических методов, хемилюминесцентный анализ также требует градуировки. Направление потоков световой энергии, поясняющих принцип хемилуцинометрии, показан на [рис. 1.53](#). Пример хемилуцинометра представлен на [рис. 1.54](#).

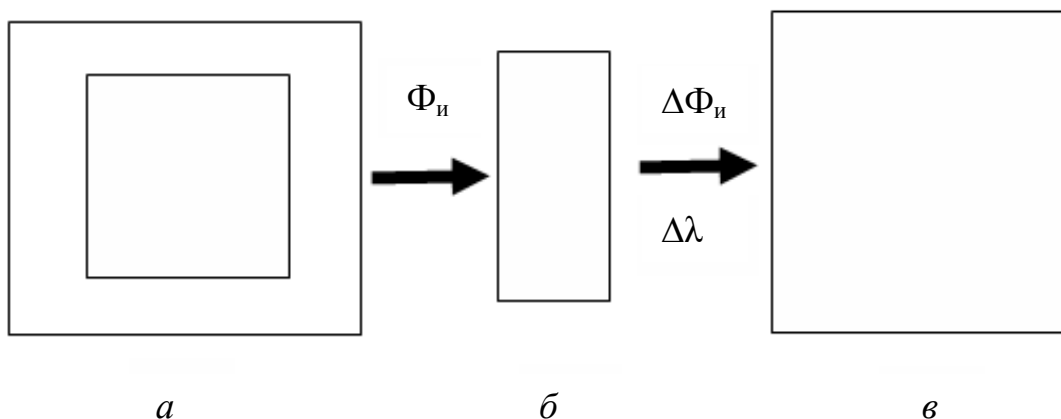


Рис. 1.53. Направление световых потоков в хемилуцинометре: *а* – кювета с исследуемой средой, излучающей световую энергию; *б* – полосовой фильтр, пропускающий поток излученной световой энергии в полосе длин волн  $\lambda_1$ ; *в* – фотоприемник;  $\Phi_{\text{и}}$  – поток световой энергии, излучаемый исследуемой средой;  $\Delta\Phi_{\text{и}}$  – поток световой энергии излучения в полосе длин волн



Рис. 1.54. Биохемилюминесцентный анализатор БХЛМ 3606  
(СКТБ «Наука», Россия)

В аналитической практике нашли наибольшее применение такие хемилюминесцентные индикаторы, как люминол, люцегитин, лафин и силаксен. Частный случай хемилюминесценции — *биолюминесценция*, имеющая биологическую природу свечения. При биолюминесценции выделение световой энергии излучения происходит в результате окислительного процесса, катализируемого ферментами — люциферазами. Эти ферменты получают из биологических систем. Наиболее широко известны два типа люциферазы: светлячковая и бактериальная. Пример биолюминометра приведен на [рис. 1.55](#).

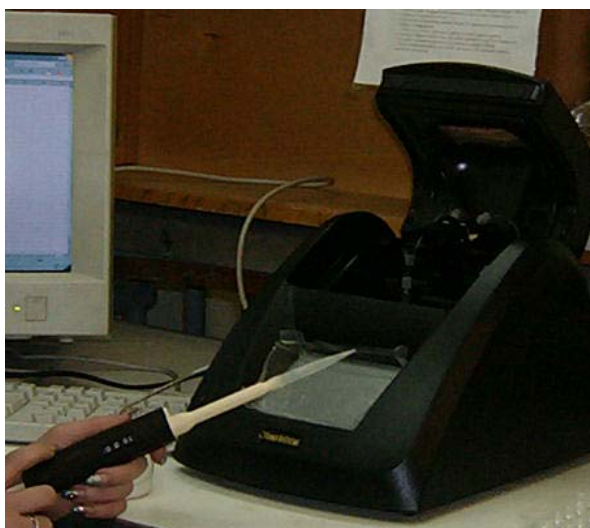


Рис. 1.55. Биолюминометр *Terner BioSystes* (*Terner BioSystems, Sunnyvale, USA*)

Поскольку биологические катализаторы-ферменты, как правило, чрезвычайно избирательны, то биолюминесцентные методы очень специфичны. Подробнее о применении этих методов изложено в [гл. 5](#).

## **ГЛАВА 2. ФОТОБИОХИМИЧЕСКИЕ И ФОТОБИОФИЗИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА**

### **П л а н   г л а в ы**

2.1.Химические свойства электронно-возбужденных молекулярных состояний.

2.2.Квантовый выход и скорость фотохимической реакций.

2.3.Основные типы фотохимических реакций.

2.4.Основные законы фотохимии.

2.5.Физические процессы, протекающие в возбужденных молекулах при фотохимических превращениях. Виды люминесценции

2.6.Систематика молекул по спектрально-люминесцентным свойствам.

2.7.Фотолюминесценция. Фотолюминесценция биологических молекул и альтернативные пути растраты энергии возбуждения. Основные параметры люминесценции.

2.8.Флуоресценция: основные характеристики и параметры.

2.8.1.Стоксов сдвиг.

2.8.2.Независимость спектра испускания от длины волны возбуждения.

2.8.3.Правило зеркальной симметрии.

2.8.4.Принцип Франка – Кондона.

2.8.5.Времена затухания и квантовые выходы флуоресценции.

2.8.6.Анизотропия флуоресценции.

2.8.7.Временная шкала молекулярных процессов в растворе.

2.9.Тушение флуоресценции. Уравнение Штерна – Фольмера.

2.9.1.Статическое тушение.

2.9.2.Смешанное динамическое и статическое тушение.

2.9.3.Тушители флуоресценции.

2.10.Биологически важные флуоресцирующие молекулы.

2.11.Природные флуорофоры.

2.11.1.Аминокислоты.

2.11.2.Коферменты.



[2.11.3.Нуклеиновые кислоты.](#)

[2.11.4.Пигменты.](#)

[2.12.Искусственные флуорофоры](#)

[2.12.1.Флуорофоры для связывания с белками.](#)

[2.12.2.Гидрофобные мембранные зонды.](#)

[2.12.3.Длинноволновые зонды.](#)

[2.12.4.Метки для ДНК.](#)

[2.12.5.Флуоресцентные химические индикаторы.](#)

[2.12.6.Флуорогенные зонды.](#)

[2.12.7.Структурные аналоги биомолекул.](#)

[2.12.8.Зонды для определения вязкости.](#)

[2.12.9.Применение и выбор флуорофоров.](#)

[2.13.Флуоресцентные белки](#)

[2.13.1.Фикобилипротеины.](#)

[2.13.2.Белки семейства зеленого флуоресцентного белка.](#)

[2.13.3.Фитофлуоры.](#)

[2.14.Процессы, изучаемые с помощью флуоресценции](#)

[2.14.1.Тушение люминесценции.](#)

[2.14.2.Перенос энергии.](#)

[2.14.3.Поляризация и анизотропия флуоресценции.](#)

## 2.1. Химические свойства электронно-возбужденных молекулярных состояний

Аналогично атомам электронные переходы молекул можно также классифицировать по орбитальному признаку. Электронная структура молекул это совокупность всех электронных орбиталей молекулы. В зависимости от симметрии электронных облаков, в результате перекрывания которых образуется химическая связь, суммарное электронное облако будет иметь различную симметрию, в соответствии с которой связи распадаются на три вида:  $\sigma$ -,  $\pi$ - и  $\delta$ - связи.  $\sigma$ -связь осуществляется при перекрывании облаков вдоль линии, соединяющей центры атомов, максимальная электронная плотность достигается в межъядерном пространстве и имеет цилиндрическую симметрию относительно линии, соединяющей центры атомов (рис. 2.1). В образовании  $\sigma$ -связи в силу своей шаровой симметрии всегда принимают участие  $s$ -электроны. Они образуют  $\sigma$ -связь в результате перекрывания со следующими электронами другого атома:  $s$ -,  $p_x$ -,  $d_{x^2-y^2}$ -электронами. С электронами, находящимися на других орбиталях, например,  $p_y$  или  $p_z$ , возникновение химической связи невозможно, так как происходит перекрывание в областях, где электронная плотность имеет противоположные знаки. Возможность образования  $\sigma$ -связи  $s$ -электронами не исчерпывается, она может образоваться в случае перекрывания и других электронных облаков, таких как двух  $p_x$  или  $p_x$  и  $d_{x^2-y^2}$ .

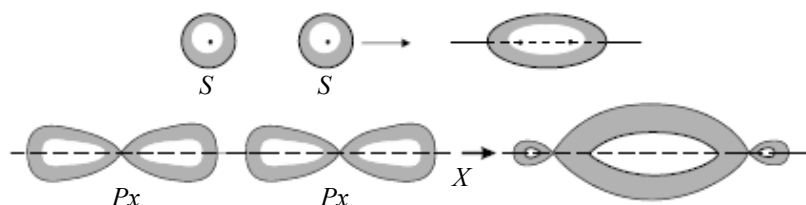


Рис. 2.1. Примеры образования  $\sigma$ -связей

$\pi$ -связи возникают при перекрывании электронных облаков над и под линией, соединяющей центры атомов (рис. 2.2). Суммарные электронные облака также симметрично расположены относительно этой оси, но они не имеют цилиндрической симметрии, как в случае  $\sigma$ -связи. В силу своего пространственного расположения  $\pi$ -связь образуют электроны на таких парах орбиталей, как  $p_y - p_y$ ,  $p_z - p_z$ ,  $p_y - d_{xy}$ .

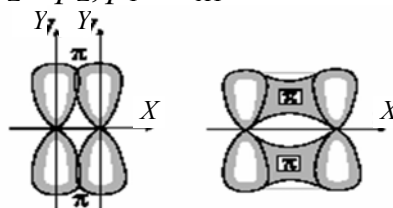


Рис. 2.2. Примеры образования  $\pi$ -связей



Различное строение  $\sigma$ - и  $\pi$ -молекулярных орбиталей определяет характерные особенности  $\sigma$ - и  $\pi$ -связей.  $\sigma$ -связь прочнее  $\pi$ -связи. Это обусловлено более эффективным перекрыванием атомных орбиталей при образовании  $\sigma$ -молекулярных орбиталей и нахождением  $\sigma$ -электронов между ядрами. По  $\sigma$ -связям возможно *внутримолекулярное вращение* атомов, так как форма  $\sigma$ -молекулярных орбиталей допускает такое вращение без разрыва связи. Вращение по  $\pi$ -связи невозможно без ее разрыва. Электроны на  $\pi$ -молекулярных орбиталях, находясь вне межъядерного пространства, обладают большей подвижностью по сравнению с  $\sigma$ -электронами. Поэтому поляризуемость  $\pi$ -связи значительно выше, чем  $\sigma$ -связи.

$\delta$ -связь образуют только  $d$ -электроны за счет перекрывания всех четырех своих лепестков электронных облаков, расположенных в параллельных плоскостях. Такое возможно, когда в образовании связи участвуют  $d_{xy} - d_{xy^-}$ ,  $d_{xz} - d_{xz^-}$ ,  $d_{yz} - d_{yz^-}$ -электроны.

Электронная структура молекул – это совокупность всех электронных орбиталей молекулы. В упрощенном приближении  $\sigma$ -орбитали можно рассматривать локализованными между двумя атомами,  $\pi$ -орбитали – делокализованными, образующими  $\pi$ -систему (подсистему) молекулы. В более общем случае многоатомные молекулы, особенно содержащие гетероатомы, можно представить как сложную систему, в которой проявляются *двойственные свойства электронов*: делокализация и относительная локализация их орбиталей на определенных атомах и группах. Напомним, что орбитали, образующиеся в результате усреднения энергий подуровней, называются *гибридными* (рис. 2.3).

$n$ -орбитали образуются при  $sp^2$ -гибридизации орбиталей гетероатомов (например, кислорода, азота, серы в группах  $>C=O$ ,  $>C=N-$ ,  $>C=S$ ,  $-N=O$ ,  $-NO_2$ ,  $-N=N-$  и др.). В этих случаях орбитали, занятые парой электронов гетероатома, расположены в плоскости молекулы (имеют  $p_x$ - или  $p_y$ -характер) и поэтому не могут участвовать в  $\pi$ -делокализации системы (рис. 2.4).

$v$ - и  $l$ -орбитали – вакантные и занятые орбитали гетероатомов, которые не принимают участия в образовании валентных связей. Эти орбитали могут принимать участие в  $\pi$ -делокализации, являясь при этом в какой-то степени автономными.

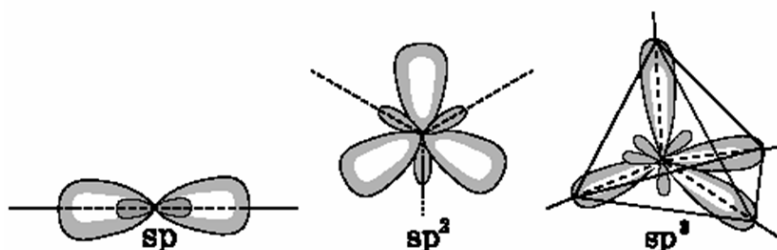


Рис. 2.3. Типы гибридизации и пространственные конфигурации образовавшихся гибридных орбиталей



В плоских молекулах (например, ароматические спирты, акридоны и др.) *l*-орбитали можно отождествлять с  $p_z$ -орбиталями (рис. 2.5). Вакантными  $\nu$ -орбиталями, принимающими участие в  $\pi$ -делокализации, являются свободные  $p$ -орбитали гетероатомов.

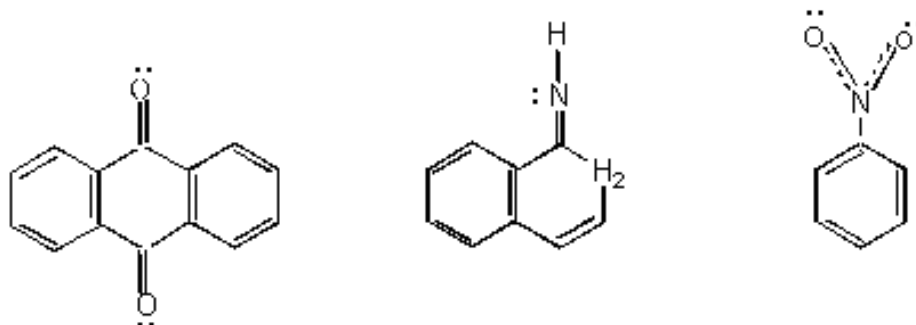


Рис. 2.4. *n*-орбитали ароматических соединений (*n*-электроны обозначены точками)

*l*-орбитали – занятые орбитали гетероатомов, они не принимают участия в образовании валентных связей; могут принимать участие в  $\pi$ -делокализации. В плоских молекулах, например ароматические спирты, акридоны и др., *l*-орбитали можно отождествлять с  $p_z$ -орбиталями. Орбитали *n*-, *l*-,  $\nu$ -типа способны принимать участие в образовании донорно-акцепторных связей.

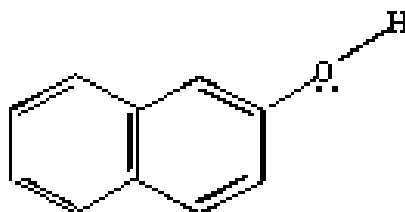


Рис. 2.5. *l*-орбитали в ароматических спиртах (*l*-электроны обозначены точками)

Квантово-механическое рассмотрение молекул позволяет выделить 5 типов орбиталей –  $\sigma$ ,  $\pi$ , *n*, *l*,  $\nu$  – и положить их в основу классификации молекул. Предполагается, что принцип Паули и правило Хунда выполняются и для молекул, а две атомные орбитали при взаимодействии образуют две молекулярные орбитали – связывающую и разрыхляющую. Эти молекулярные орбитали являются линейной комбинацией атомных орбиталей:

$$\psi = \psi_A + \psi_B \text{ — связывающая орбиталь,}$$

$$\psi^* = \psi_A - \psi_B \text{ — разрыхляющая орбиталь.}$$

При сложении атомных орбиталей (АО) образуется молекулярная орбиталь, энергия которой понижается относительно энергий атомных орбиталей. Такая молекулярная орбиталь (МО) называется связывающей. Волновая функция, соответствующая связывающей орбитали, получается в результате сложения волновых функций с одинаковым знаком. Электронная плотность при этом концентрируется между ядрами, и волновая функция принимает положительное значение. При вычитании атомных орбиталей энергия молекулярной орбитали повышается. Эта орбиталь называется разрыхляющей. Электронная плотность в этом случае располагается за ядрами, а между ними равна нулю. Волновая функция в двух образовавшихся электронных облаках имеет противоположные знаки, что хорошо видно из схемы образования связывающей и разрыхляющей орбиталей, приведенной на [рис. 2.6](#). Когда атомная орбиталь одного из атомов вследствие большой разницы в энергии или симметрии не может взаимодействовать с атомной орбиталью другого атома, она переходит в энергетическую схему молекулярных орбиталей молекулы с энергией, соответствующей ей в атоме. Орбиталь этого типа называется *несвязывающей* или разрыхляющей.

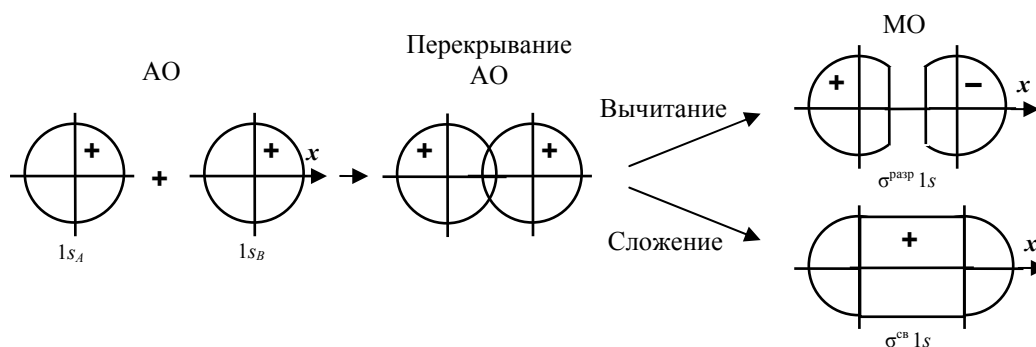


Рис. 2.6. Схема образования связывающей и разрыхляющей молекулярных орбиталей

Для молекул, образованных атомами одного химического элемента (гомоядерных), выигрыш в энергии за счет образования связывающей орбитали компенсируется повышением энергии разрыхляющей орбитали. На энергетической диаграмме обе орбитали располагаются симметрично относительно атомных орбиталей ([рис. 2.7](#)).

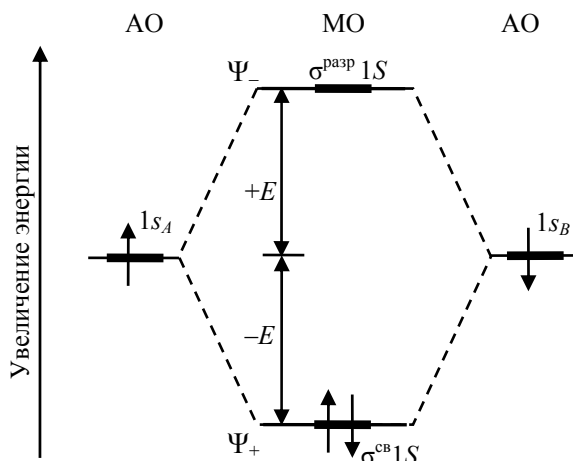


Рис. 2.7. Энергетическая диаграмма молекулярных орбиталей для гомоядерных молекул (на примере молекулы водорода)

В гетероядерных (разноэлементных) молекулах связывающие орбитали по энергии ближе к орбиталям более электроотрицательного атома ( $B$ ), а разрыхляющие – ближе к орбитали менее электроотрицательного атома ( $A$ ). Разность в энергиях исходных атомных орбиталей ( $b$ ) равна полярности связи. Эта разность является мерой ионности связи, а разность в энергиях между связывающей орбиталью и атомной орбиталью более электроотрицательного атома определяет ковалентность связи (рис. 2.8).

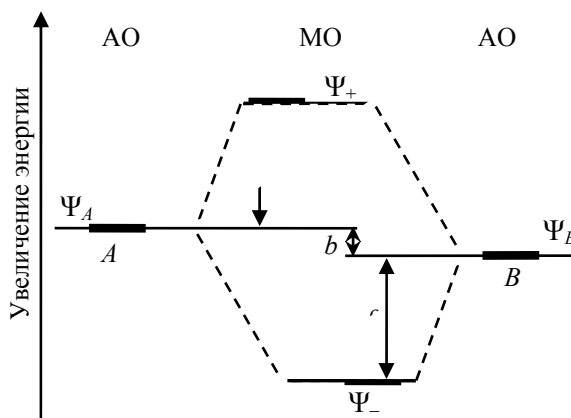


Рис. 2.8. Энергетическая диаграмма молекулярных орбиталей для гетероядерной молекулы

На связывающей молекулярной орбитали потенциальная энергия электронов оказывается меньше, чем на атомных орбиталях, а на разрыхляющей – больше (рис. 2.7 и рис. 2.8). По абсолютной величине увеличение энергии электронов на разрыхляющих орбиталях несколько больше уменьшения энергии на связывающих орбиталях. Электрон, находящийся на связывающей орбитали, обеспечивает связь между атомами, стабилизируя молекулу, а электрон на разрыхляющей орбитали

дестабилизирует молекулу, т. е. ослабляет связь между атомами. Заселение разрыхляющей связи в каком-либо химическом процессе часто ведет к разрыву этой связи.

Если при образовании молекулы из атомов электроны в молекуле попадают на связывающие орбитали, то потенциалы ионизации молекул должны быть больше, чем потенциалы ионизации атомов, а если электроны попадают на разрыхляющие орбитали, то наоборот.

Образование связывающих орбиталей является энергетически выгодным, поскольку энергия при этом уменьшается (относительно свободных атомов). Образование разрыхляющей орбитали связано с повышением энергии. Самой низкой по энергии является связывающая  $\sigma$ -орбиталь, далее следует связывающая  $\pi$ -орбиталь. Самой высокой по энергии является разрыхляющая  $\sigma^*$ -орбиталь (рис. 2.9).

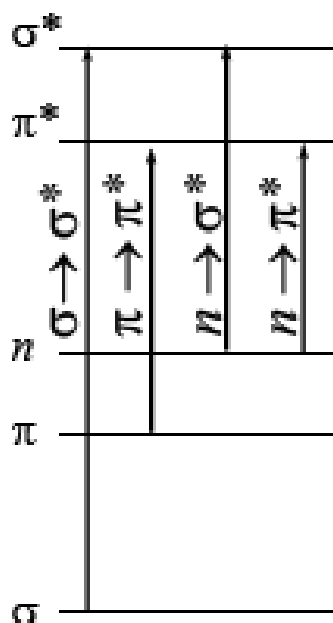


Рис. 2.9. Уровни энергии молекулы и электронные переходы при поглощении энергии

Среди электронных переходов в молекулах (рис. 2.9) наибольшее значение имеют  $n \rightarrow \pi^*$ - и  $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходы, поскольку их энергия соответствует видимой или ближней ультрафиолетовой области, а вероятность  $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходов достаточно велика, и поэтому соответствующие полосы поглощения обладают достаточной интенсивностью. Электронные переходы  $n \rightarrow \sigma^*$  и  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  требуют большой энергии и наблюдаются в далекой УФ-области.

Из спектров поглощения некоторых биологически важных соединений (см. рис. 1.17) видно, что чем больше в молекуле число сопряженных двойных связей, тем больше длина волны максимума поглощения данного вещества. С увеличением числа сопряженных связей в молекуле максимум в спектре поглощения сдвигается в сторону больших длин волн. Молекулы большинства веществ, поглощающих свет в видимой и ближней

ультрафиолетовой областях спектра, имеют наряду с сопряженными двойными связями гетероатомы (например, атом азота в индольном кольце триптофана), входящие в систему сопряженных связей или непосредственно примыкающие к ней (рис. 2.10).

Энергия верхних заполненных электронных уровней у неподеленных электронов таких гетероатомов (*n*-орбитали) значительно превышает не только энергию  $\sigma$ -электронов, образующих одинарные связи между атомами ( $\sigma$ -орбитали), но часто превышает и энергию заполнения орбиталей сопряженных двойных связей ( $\pi$ -орбитали).

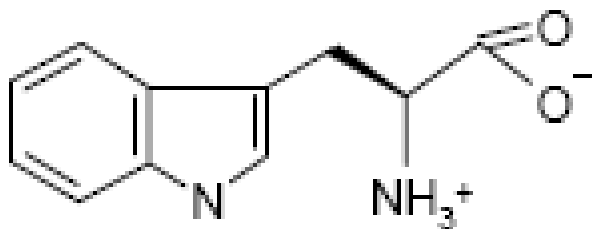


Рис. 2.10. Структура триптофана

Переход *n*-электронов при поглощении фотона может происходить на возбужденный уровень  $\pi$ -электронов ( $\pi^*$ -орбиталь) (*n*– $\pi^*$ -переход). Соответствующая ему длина волны может быть большей, чем при  $\pi$ – $\pi^*$ -переходе в той же молекуле. Переход проявляется чаще в виде длинноволнового плеча на основной полосе поглощения, поскольку молярный коэффициент *n*– $\pi^*$ -поглощения обычно невелик. Наиболее изучен *n*– $\pi^*$ -переход в карбонильной группе  $>C=O$ , входящей в состав ацетона, пептидных связей и т. д. Длина волны максимума полосы поглощения, обусловленного *n*– $\pi^*$ -переходом в ацетоне, расположена около 280 нм;  $\epsilon_{\max} = 17$  л/(моль·см).

Все рассматриваемые молекулы, согласно классификации Д. Н. Шигорина, могут быть разбиты по орбитальному признаку на 8 классов: I –  $\sigma\pi$ , II –  $\sigma\pi\nu$ , III –  $\sigma\pi l$ , IV –  $\sigma\pi l\nu$ , V –  $\sigma\pi n$ , VI –  $\sigma\pi n\nu$ , VII –  $\sigma\pi n l$ , VIII –  $\sigma\pi n l\nu$  (табл. 2.1).

Таблица 2.1

Орбитальная классификация молекул, электронных переходов и состояний

Молекула		Переход	Состояние
Класс	Орбитали		
I	$\sigma\pi$	$\pi \rightarrow \pi^*$ , $\sigma \rightarrow \pi^*$	$S_0, S_{\pi,\pi}^*, T_{\pi,\pi}^*$
II	$\sigma\pi\nu$	$\pi \rightarrow \nu\pi^*$	$S_0, S_{\pi,\nu\pi}^*, T_{\pi,\pi}^*$
III	$\sigma\pi l$	$\pi l \rightarrow \pi^*$	$S_0, S_{\pi l,\pi}^*, T_{\pi l,\pi}^*$
IV	$\sigma\pi l\nu$	$\pi l \rightarrow \nu\pi^*$	$S_0, S_{\pi l,\nu\pi}^*, T_{\pi l,\nu\pi}^*$
V	$\sigma\pi n$	$n \rightarrow \pi^*$ , $\pi \rightarrow \pi^*$ , $\pi \rightarrow \pi^*\pi_n^*$	$S_0, S_{n,\pi}^*, T_{n,\pi}^*, S_{\pi,\pi}^*, T_{\pi,\pi}^*,$ $S_{\pi,\pi}^*\pi_n^*, T_{\pi,\pi}^*\pi_n^*$
VI	$\sigma\pi n\nu$	$n \rightarrow \nu\pi^*$ , $\pi \rightarrow \nu\pi^*$ , $\pi \rightarrow \nu\pi^*\pi_n^*$	$S_0, S_{n,\nu\pi}^*, T_{n,\nu\pi}^*, S_{\pi,\nu\pi}^*, T_{\pi,\nu\pi}^*,$ $S_{\pi,\nu\pi}^*\pi_n^*, T_{\pi,\nu\pi}^*\pi_n^*$
VII	$\sigma\pi n l$	$n \rightarrow \pi^*$ , $\pi l \rightarrow \pi^*$ , $\pi l \rightarrow \pi^*\pi_n^*$	$S_0, S_{n,\pi}^*, T_{n,\pi}^*, S_{\pi l,\pi}^*, T_{\pi l,\pi}^*,$ $S_{\pi l,\pi}^*\pi_n^*, T_{\pi l,\pi}^*\pi_n^*$
VIII	$\sigma\pi n l\nu$	$n \rightarrow \pi^*$ , $\pi l \rightarrow \nu\pi^*$ , $\pi l \rightarrow \nu\pi^*\pi_n^*$	$S_0, S_{n,\nu\pi}^*, T_{n,\nu\pi}^*, S_{\pi l,\nu\pi}^*, T_{\pi l,\nu\pi}^*,$ $S_{\pi l,\nu\pi}^*\pi_n^*, T_{\pi l,\nu\pi}^*\pi_n^*$

Молекулы этих классов имеют спектры, лежащие в видимой и ультрафиолетовой областях. При поглощении или выделении энергии между невозбужденными и возбужденными состояниями молекулы могут осуществляться электронные переходы. Для каждого класса молекул характерны свои типы переходов (табл. 2.1, столбец «переход»). В табл. 2.1 приведены переходы, лежащие только в видимой и ультрафиолетовой областях. Поэтому для некоторых классов соединений не указаны переходы с участием  $\sigma$ - и  $\sigma^*$ -орбиталей.

Природа электронных состояний молекул (табл. 2.1, последний столбец) определяется двумя основными характеристиками: орбитальной природой и мультиплетностью состояний, между которыми осуществляется переход.

Наиболее используемая характеристика электронных состояний молекул – мультиплетность  $M = 2S + 1$ , где  $S$  – суммарный спин всех электронов молекулы. Состояния с полным спином  $S = 0$  и  $M = 1$  называются

синглетными и обозначаются символом  $S$ . Состояния с  $S = 1$  и  $M = 3$  называются *триплетными* и обозначаются  $T$ . Триплетное состояние расположено ниже соответствующего синглетного на величину  $K_{ij}$ , где  $K_{ij}$  – обменный интеграл для двух электронов, один из которых находится на занятой орбитали  $i$ , а другой перешел на вакантную  $j$ .

Электронные состояния схематически изображаются уровнями энергии электронных состояний. Общая схема энергетических уровней многоатомных молекул может быть представлена так, как она изображена на [рис. 2.11](#) на примере соединения, принадлежащего V классу ( $\sigma\pi$ ). Каждому из электронных уровней приписываются определенная мультиплетность и орбитальная природа. При этом каждому электронному состоянию соответствует набор колебательных подуровней.

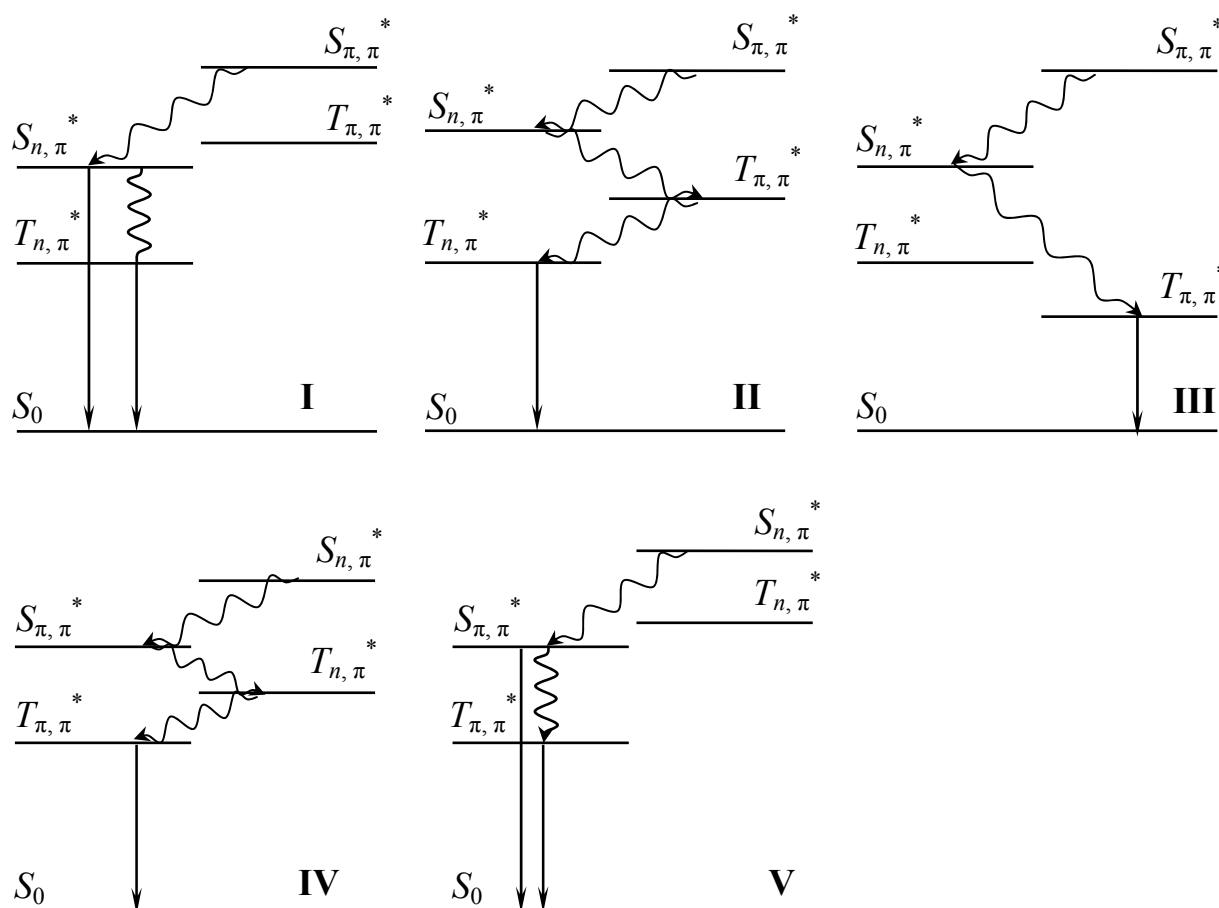


Рис. 2.11. Относительное положение уровней электронно-возбужденных состояний молекул класса  $\sigma\pi$ : волнистые стрелки обозначают безызлучательные переходы, прямые стрелки – излучательные переходы

Электронные состояния, возникающие в результате оптических переходов в видимой и ближней ультрафиолетовой областях, могут интерпретироваться как  $\sigma, \pi^*$ ,  $\pi, \pi^*$ ,  $n, \pi^*$  и т. д. При  $\sigma \rightarrow \pi^*$ -переходе образуется  $\sigma, \pi^*$ -состояние. При этом электрон с невозбужденной



связывающей  $\sigma$ -орбитали переходит на возбужденную разрыхляющую  $\pi^*$ -орбиталь. При  $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходе (и образовании  $\pi, \pi^*$ -состояния) электрон с  $\pi$ -связывающей орбитали переходит также на разрыхляющую  $\pi^*$ -орбиталь. При  $n \rightarrow \pi^*$ -переходе (с образованием  $n, \pi^*$ -состояния) сначала происходит смещение электронной плотности с несвязывающей  $n$ -орбитали гетероатома (например кислорода) на  $\pi$ -систему молекулы. Карбонильная группа приобретает частичный положительный заряд (рис. 2.12).

Это характерно для синглетного состояния  $n, \pi^*$ -типа. Такие короткоживущие состояния могут быть активны в процессах акцептирования электрона по карбонильным группам, что может являться первичным фотохимическим процессом в фотохимической реакции. Может произойти полный разрыв  $\pi$ -связи в карбонильной группе. При этом электрон неподеленной пары гетероатома с несвязывающей орбитали переходит на разрыхляющую  $\pi^*$ -орбиталь и делокализуется по всей ароматической подсистеме молекулы. Образуется аналог бирадикала, локализованный на карбонильной группе молекулы. Таким образом, можно упрощенно представить триплетное состояние  $n, \pi^*$ -типа. Это состояние активно в реакциях радикального присоединения.

В ароматических молекулах  $\sigma, \pi^*$ - и  $n, \pi^*$ -возбуждения локализованы на фрагментах (подсистемах) соединения, в то время как  $\pi, \pi^*$ -возбуждение делокализовано по ароматической подсистеме соединения.

Если происходит смешивание электронных состояний, орбитальная природа результирующих электронных состояний определяется уже вкладом различных конфигураций. Так, состояния  $\pi, \nu \pi^*$ ;  $\pi l, \pi^*$ ;  $\pi l, \nu \pi^*$ ;  $\pi, \pi^* \pi_m^*$ ;  $\pi l, \pi^* \pi_n^*$  могут рассматриваться как аналоги  $\pi \pi^*$ -состояния, которое по своим свойствам резко отличается от  $n, \pi^*$ -состояний. Смешанный характер всех отмеченных состояний может быть описан на основе принципа суперпозиции как линейная комбинация электронных конфигураций  $\varphi_i$ , возникающих в результате одноэлектронных переходов:

$$\psi = \sum_i c_i \varphi_i,$$

здесь  $\psi$  – волновая функция,  $c_i$  – удельный вес  $i$ -го состояния.

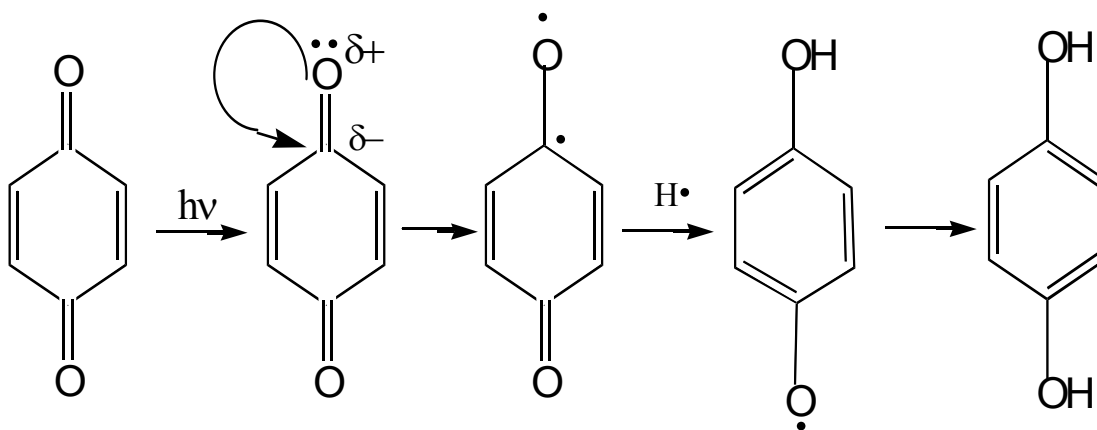


Рис. 2.12. Эволюция  $n, \pi^*$ -состояний

Конфигурации  $l, \pi^*$ ;  $\pi, \nu$  и  $\pi, \pi_n^*$ -переход с  $\pi$ -орбитали углеводородной системы на  $\pi_n^*$ -орбиталь электронно-акцепторной группы  $>C=O$  и т. п. принято называть *конфигурациями переноса заряда*. Уровни энергии различных состояний определяются экспериментально по спектрам испускания и поглощения, а также могут быть рассчитаны с помощью полуэмпирических квантово-механических методов.

В простейшем случае, когда рассматривается система двух уровней, квадрат энергии их взаимодействия (возмущения) обратно пропорционален разности энергий этих двух уровней. Это означает, что при прочих равных условиях взаимодействие уровней зависит от их относительного положения. Например, если в системе электронные переходы могут происходить с орбиталей  $\pi$  и  $l$  основного состояния на  $\pi^*$ -орбиталь возбужденного состояния ( $\pi \rightarrow \pi^*$  и  $l \rightarrow \pi^*$ -переходы), то эффективность взаимодействия уровней ( $\pi, \pi^*$  и  $l, \pi^*$ ) будет определяться относительным положением уровней энергии  $\pi$ - и  $l$ -орбиталей.

## 2.2. Квантовый выход и скорость фотохимической реакции

Квантовый выход образования продукта фотохимической реакции – количественная характеристика эффективности использования световой энергии; соотношение количества образовавшегося продукта  $\Delta N$  к количеству света, поглощенного исходным веществом  $\Delta I_a$ :

$$Q = \frac{\Delta N}{\Delta I_a}.$$

Величина квантового выхода в общем случае зависит от времени, в течение которого проводится измерение. Величина  $Q$  называется *дифференциальным квантовым выходом продукта фотореакции*, если рассчитывается как отношение скорости образования продукта  $W_p$  к скорости поглощения света  $W_a = I_a$  в единицу времени:

$$Q = W_p / W_a.$$

Интегральным квантовым выходом называется соотношение

$$Q_r = \frac{\int_0^t \Phi dt}{t}.$$

Химический квантовый выход – отношение количества образовавшегося продукта к количеству прореагировавшего исходного соединения. Следовательно, химический выход тем выше, чем выше селективность фотохимической реакции (квантовый выход при этом может быть невысоким).

Количественной оценкой эффективности использования световой энергии в фотохимических реакциях является *квантовый выход*. Скорость реакции в химии основного состояния определяется величинами элементарных констант скорости и концентрации реагентов. Скорость фотохимического процесса определяется величиной квантового выхода и интенсивностью поглощаемого системой света.

Квантовый выход фотохимической реакции при стационарном облучении является вероятностью протекания того или иного процесса. Квантовый выход определяется соотношением элементарных констант скорости различных процессов гибели возбужденных молекул. На [рис. 2.13](#) представлена кинетическая схема образования продукта фотохимической реакции из синглетного возбужденного состояния с константами скорости фотохимической реакции  $k_R$  и дезактивации возбужденной молекулы  $k_d$ .

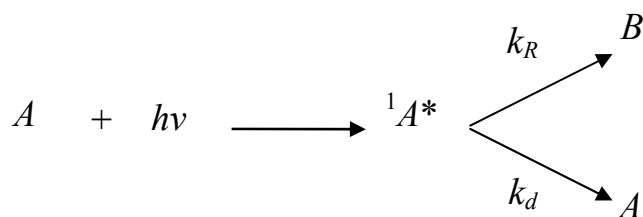


Рис. 2.13. Кинетическая схема образования продукта фотохимической реакции

Из условия стационарности

$$\frac{d[{}^1A^*]}{dt} = I_a - (k_R + k_d)[{}^1A^*] = 0$$

получаем выражение для квантового выхода образования продукта  $B$ :

$$Q_R = \frac{k_R}{k_R + k_d} = k_R \tau \leq 1,$$

где  $\tau$  – время жизни возбужденных молекул  $A$ .

В общем случае для реакций, протекающих из синглетного возбужденного состояния, можно записать, что квантовый выход образования продукта реакции есть отношение константы скорости его образования из возбужденной молекулы исходного соединения к сумме всех констант скорости процессов превращения синглетных возбужденных молекул:

$$Q_i = \frac{k_i}{\sum_j k_j}.$$

Поскольку величина  $1/\sum k_j = \tau_s$  представляет собой время жизни синглетных возбужденных молекул, то выражение для квантового выхода можно переписать в виде

$$Q_i = k_i \tau_s.$$

Как правило, под квантовым выходом образования продукта реакции подразумевают понятия либо суммарного квантового выхода, либо квантового выхода отдельных стадий фотохимических процессов.

### 2.3. Основные типы фотохимических реакций

Химическая активность электронно-возбужденного состояния определяется основными параметрами: запасом энергии, временем жизни и наличием реакционно-активных электронов на внешней орбите. Синглетное ( $S^*$ ) возбужденное состояние обладает большим запасом энергии, чем триплетное ( $T^*$ ), что расширяет пределы его реакционной способности. С другой стороны, триплетное состояние обладает значительно большим временем жизни и, что особенно важно, имеет на внешней орбите химически реакционно-способные неспаренные электроны.

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.

**Фотодиссоциация** – одна из простейших фотохимических реакций (рис. 2.14). В основном состоянии диссоциация связи происходит при увеличении колебательной энергии до энергии разрыва связи. Энергия химических связей находится в интервале 150–500 кДж/моль. Энергия фотона при длине волны 250 нм равна 480 кДж/моль, и при облучении светом 250 нм большинство химических связей могли бы диссоциировать. На самом деле при поглощении света молекулы переходят в другое электронное состояние с иными энергиями связи. Поэтому для диссоциации связи в электронно-возбужденном состоянии необходима энергия, равная, по меньшей мере, сумме энергии возбуждения ( $E_{00}$ ) и энергии связи в возбужденном состоянии. Кроме того, для сложных молекул при поглощении света происходит распределение энергии возбуждения по различным связям.

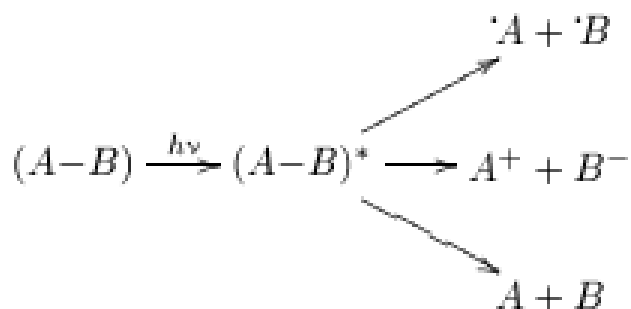


Рис. 2.14. Схема реакции фотодиссоциации

При фотовозбуждении двухатомных молекул наблюдаются три типа диссоциации. Диссоциация первого типа происходит, если энергия фотона превышает сумму энергий 0–0-перехода и энергии диссоциации связи в возбужденном состоянии (рис. 2.15, а). В этом случае двухатомная молекула распадается на два атома и, как правило, один из атомов находится в возбужденном состоянии. Второй тип фотодиссоциации (рис. 2.15, б) отличается тем, что терм возбужденного состояния является диссоциативным, т. е. не имеет минимума. В этом случае при диссоциации связи продукты образуются в основном состоянии.

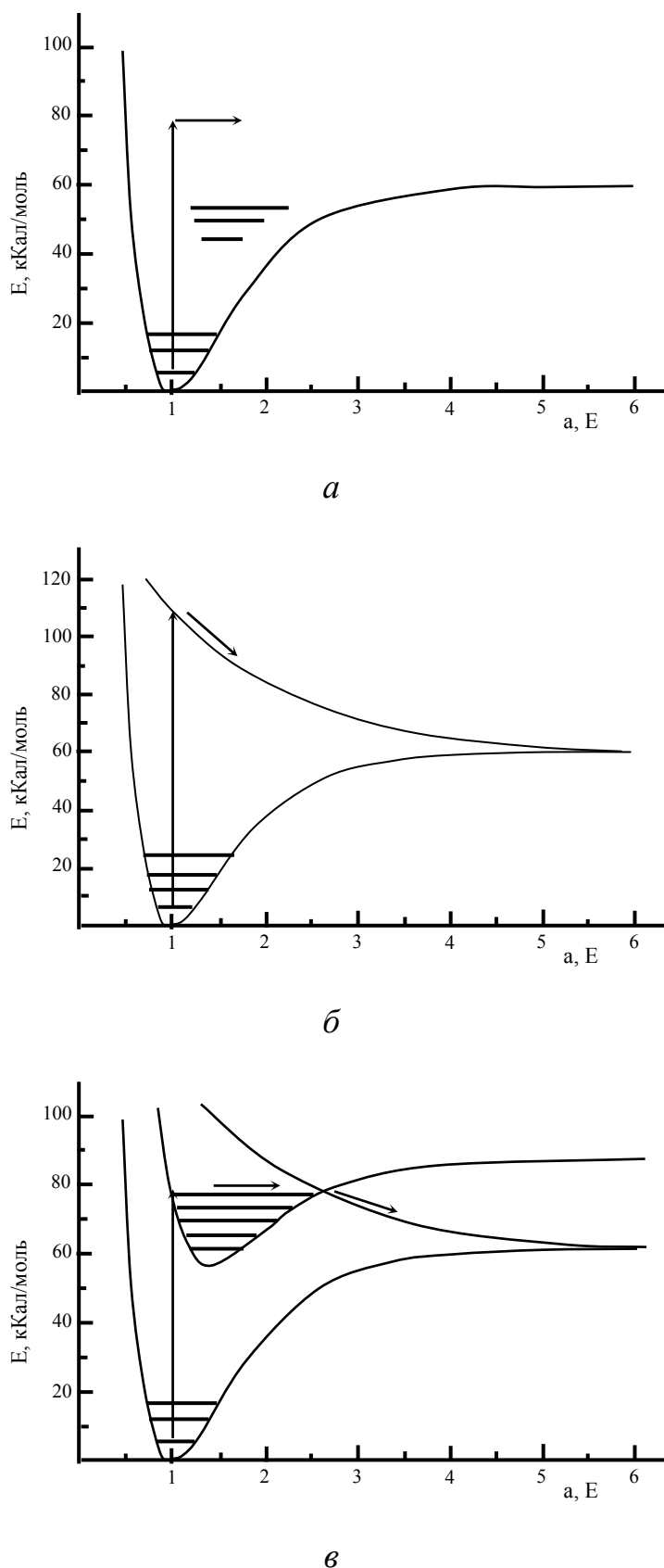


Рис. 2.15. Типы фотодиссоциации связей в двухатомных молекулах:  
*a* – I тип; *б* – II тип; *в* – III тип

Третий тип фотодиссоциации ([рис. 2.15, в](#)) наблюдается, когда в возбужденном состоянии пересекаются два терма, один из которых является

диссоциативным. В точке пересечения имеется вероятность перехода из возбужденного состояния на диссоциативную кривую. Этот тип фотодиссоциации называется преддиссоциацией.

По типу образующихся продуктов различают гомолитическую фотодиссоциацию, приводящую к образованию радикалов и атомов, и гетеролитическую фотодиссоциацию, приводящую к образованию ионов.

Гетеролитическая фотодиссоциация органических соединений может протекать лишь в полярных растворителях, где ионы могут стабилизироваться.

Фотоперегруппировки – фотореакции, в ходе которых один изомер или таутомер превращается в другой (рис. 2.16). Если перегруппировываются отдельные атомы или группы в молекуле, говорят о реакции **изомеризации**, частный случай которой – фотостериоизомеризация, заключающаяся в изменении пространственного расположения отдельных группировок в молекуле относительно ее хребта.

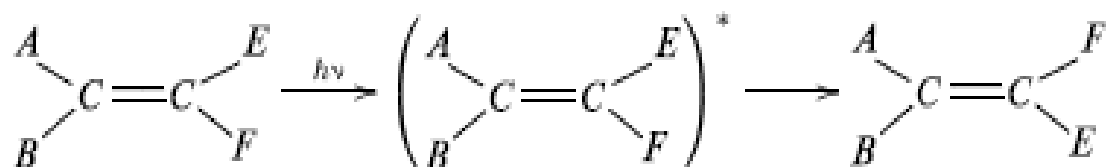
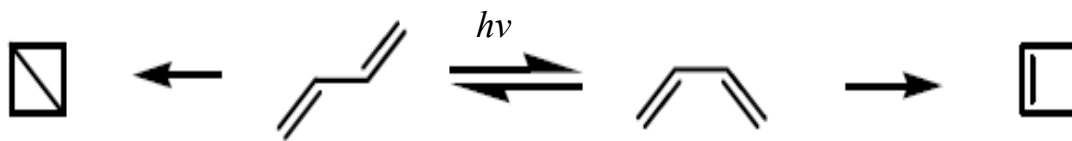


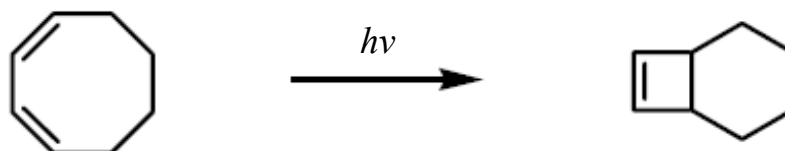
Рис. 2.16. Реакция фотоперегруппировки

Реакции фотоизомеризации и перегруппировки всегда протекают внутримолекулярно.

*Валентная фотоизомеризация* протекает с перераспределением  $\pi$ - и  $\sigma$ -связей. Так, при облучении 1,3-бутадиена происходит образование бицикло(1.1.0)бутана из *транс*-стильбена и циклобутена из *цис*-стильбена.

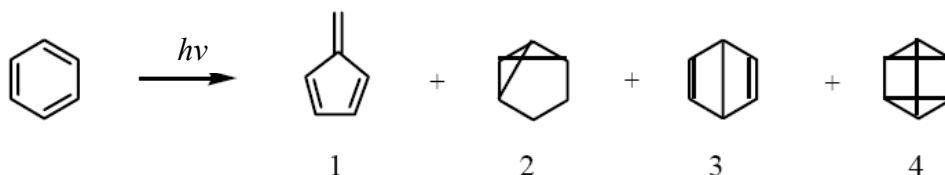


Фотолиз циклических диенов приводит к бициклическим соединениям:



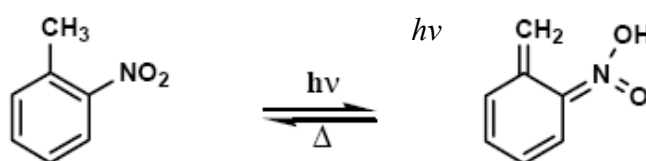
При облучении бензола наблюдается образование валентных изомеров: фульвен (1), бензвален (2), бензол Дьюара (3), призмат (4):





Причем бензвален и фульвен образуются из  $^1S$ -состояния при облучении бензола 254 нм, бензол Дьюара образуется из  $^2S$ -состояния при облучении светом 200 нм, а призматан образуется из бензола Дьюара при длительном облучении бензола светом 200 нм.

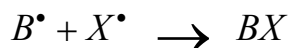
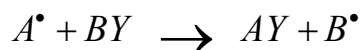
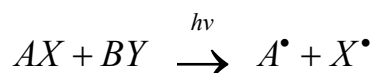
Фототаутомеризация – внутримолекулярное перемещение протона под действием света наблюдается для многих ароматических соединений:



Фототаутомеры, как правило, легко термически превращаются в таутомер, устойчивый в основном состоянии. Фотоизомеризация координационных соединений может приводить к образованию стереоизомеров (*геометрическая фотоизомеризация*), оптических изомеров (*фоторацемизация*).

Фотохимическая реакция *цис-транс-изомеризация* ретиналя (простетической группировки пигмента родопсина) лежит в основе такого общебиологического информационного процесса, как зрение животных и человека ([рис. 2.17](#)).

**Реакции фотозамещения** в органических соединениях могут протекать как по радикальному, так и по гетеролитическому механизму:



Фотозамещение в алифатических соединениях протекает в основном по радикальному пути. К реакциям фотозамещения относятся *реакции обмена лигандов* в комплексных соединениях металлов переменной валентности при их облучении в  $d-d$ -полосу. При использовании воды в качестве растворителя протекает реакция *фотогидратации*.

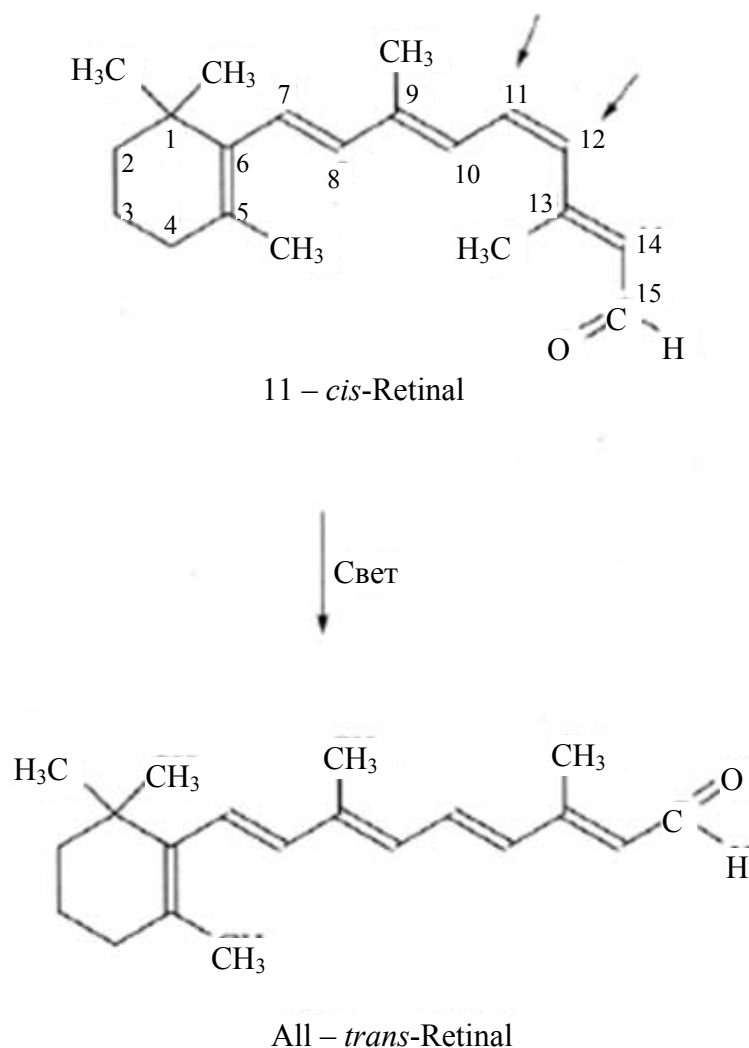
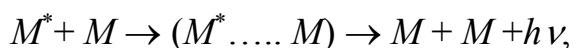


Рис. 2.17. Фотохимическая реакция *цис-транс*-изомеризации ретиналя

**Фотоприсоединение** – в возбужденном состоянии возрастает способность молекул к комплексообразованию. Различают фотодимеризацию, фотоокислирование, фотогидратацию, фотоциклизацию и др. Эффективность фотоциклизации зависит от стерических факторов ([рис. 2.18](#)). В качестве разновидности реакций фотоприсоединения можно рассматривать также образование димеров (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 и фотогидратации урацила в растворе и РНК.

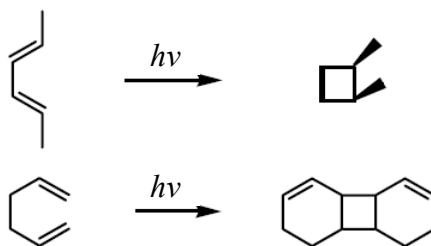


Рис. 2.18. Образование циклов при облучении диенов

**Фотоперенос электронов** – возбужденная молекула отдает свой электрон второй невозбужденной молекуле. При возбуждении молекул сильно изменяются их донорные и акцепторные свойства. При отщеплении или присоединении электрона к невозбужденным и возбужденным молекулам получаются одни и те же электронные состояния ион-радикалов, поэтому потенциал ионизации при возбуждении молекул всегда уменьшается на энергию возбуждения, а сродство к электрону увеличивается на энергию возбуждения. Перенос электрона при возбуждении молекул может происходить тремя путями: прямая фотоионизация, при взаимодействии возбужденной молекулы с донором или акцептором электрона, перенос электрона при поглощении света в полосе переноса заряда для комплексов с переносом заряда (КПЗ) ([рис. 2.19](#)).

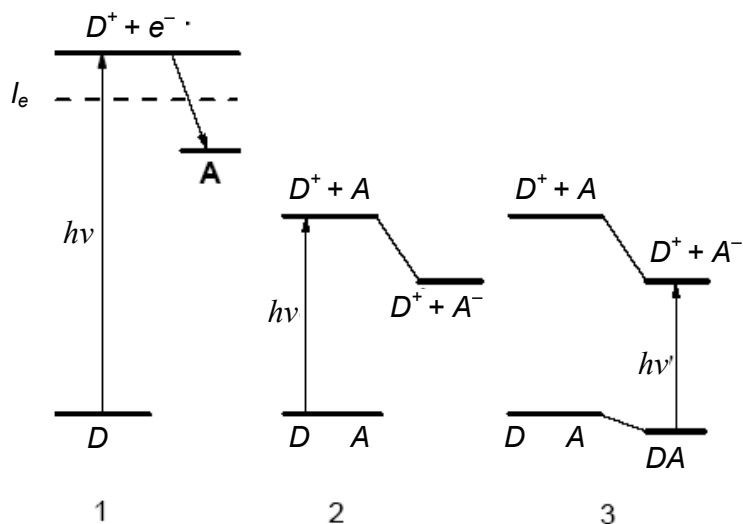


Рис. 2.19. Схема процессов переноса электрона путем прямой фотоионизации (1), переноса электрона в возбужденном состоянии (2) и фотовозбуждения комплексов с переносом заряда (3)

При возбуждении комплексов с переносом заряда происходит перенос электрона в результате поглощения фотона. Энергия, необходимая для возбуждения в полосе переноса заряда, определяется потенциалом ионизации

донора, сродством к электрону акцептора, зарядами донора и акцептора и полярностью растворителя.

**Фотоокисление** протекает в присутствии кислорода воздуха, как правило, при наличии сенсibilизаторов. Например, ароматические аминокислоты белков тирозин и триптофан под действием ультрафиолетового облучения отдают электрон молекулам окружающей их воды, который некоторое время может существовать в окружении диполей молекул  $\text{H}_2\text{O}$ :



где  $\text{АН}$  – молекула аминокислоты в основном состоянии,  ${}^1\text{АН}$  – молекула в синглетном возбужденном состоянии,  $\bullet\text{АН}^+$  – катион-радикал,  $(e^-)_s$  – сольватированный (захваченный средой) электрон.

**Фотовосстановление** – процесс, в ходе которого возбужденная молекула получает лишний электрон от невозбужденной молекулы. Важнейшие биологические реакции фотопереноса электронов: обратимое фотовосстановление хлорофилла при фотосинтезе; 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.

**Фотоперенос протона** – процесс, первичной стадией которого является отрыв атома водорода возбужденной молекулой от растворителя или от специально добавленного соединения (рис. 2.20).

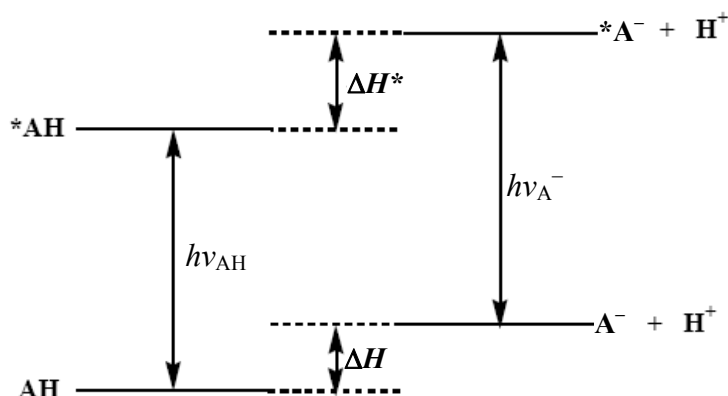


Рис. 2.20. Схема энергетических уровней при фотопереносе протона

Наряду с изменением донорно-акцепторных свойств при возбуждении молекул сильно изменяются их кислотно-основные свойства. В связи с этим меняется кислотность и основность возбужденных молекул по сравнению с основным состоянием. Константы кислотности и основности возбужденных молекул могут быть рассчитаны по методу Ферстера, который основан на измерении энергии 0–0-переходов изучаемого соединения и сопряженной с ним кислоты или основания. 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.

## 2.4. Основные законы фотохимии

Основополагающие для фотохимии принципы и закономерности сформулированы в виде ее основных законов:

1. Закон Гротгуса – Дрепера (1817 и 1843 гг. соответственно): *химические изменения в системе может вызывать только поглощаемый ею свет*. Этот закон определяет необходимое, но не достаточное для протекания фотохимической реакции условие.

2. Закон Вант-Гоффа (1904): *количество превратившегося в фотохимической реакции вещества пропорционально количеству поглощенной энергии света*.

3. Закон Штарка – Эйнштейна (закон фотохимической эквивалентности) (1912): *каждый поглощенный квант света в первичном акте вызывает активацию только одной молекулы*.

## 2.5. Физические процессы, протекающие в возбужденных молекулах при фотохимических превращениях. Виды люминесценции

Физические процессы, протекающие в возбужденных молекулах при фотохимических превращениях, могут быть классифицированы следующим образом: излучательная дезактивация (флуоресценция, фосфоресценция), внутренняя конверсия, интеркомбинационная конверсия. Поглощение и испускание света хорошо иллюстрирует диаграмма уровней энергии, предложенная Яблонским (см. [рис. 1.23](#) или [рис. 1.41](#)).

Люминесценция (от латинского *lumen* – свет и *-escent* – суффикс, означающий слабое действие) – свечение вещества, представляющее собой избыточное излучение по сравнению с тепловым излучением тела, продолжающееся в течение времени, значительно превышающего период световых колебаний. Длительность люминесценции – от  $10^{-10}$  с до нескольких часов. Первая часть определения позволяет понять принципиальное отличие люминесценции от теплового излучения: тепловое излучение в видимой области спектра заметно только при температуре тела в несколько сотен или тысяч градусов, в то время как люминесцировать тело может при любой температуре, поэтому люминесценцию часто называют холодным свечением. Признак длительности заключен во второй части определения, которая была введена С. И. Вавиловым, чтобы отделить люминесценцию от различных видов рассеяния света, отражения света, параметрического преобразования света, тормозного излучения и излучения Черенкова – Вавилова. От различных видов рассеяния люминесценция отличается тем, что при люминесценции между поглощением и испусканием

происходят промежуточные процессы, длительность которых больше периода световой волны. В результате этого при люминесценции теряется корреляция между фазами колебаний поглощенного и излученного света.

Природные явления люминесценции – северное сияние, свечение некоторых насекомых, минералов, гниющего дерева – были известны с очень давних времен. Систематически изучать люминесценцию стали с конца XIX века (Э. и А. Беккерели, Ф. Ленард, У. Крукс и др.). Интерес к исследованию свечения различных веществ привел В. К. Рентгена к открытию рентгеновских лучей, а в 1896 году А. Беккерель, занимавшийся изучением люминофоров, открыл явление радиоактивности. В установлении основных законов люминесценции, а также в развитии ее применений исключительное значение имели работы советской школы физиков, созданной С. И. Вавиловым.

Люминесценция наблюдается в видимой, ультрафиолетовой и инфракрасной областях. Классифицировать люминесценцию можно двумя способами: по природе излучения и способу получения электронно-возбужденных состояний. Рассмотрим эти два способа классификации люминесценции.

В соответствии с характеристиками природы излучения можно выделить флуоресценцию и фосфоресценцию. Излучательный переход между состояниями одинаковой мультиплетности называется *флуоресценцией*. В соответствии с определением это  $S \rightarrow S$ - и  $T \rightarrow T$ -переходы. Однако практически мы имеем дело с  $S \rightarrow S$ -переходами. Время жизни флуоресценции мало (приблизительно  $10^{-10}$ – $10^{-8}$  с), она затухает сразу после прекращения возбуждения. Излучательный переход между состояниями разной мультиплетности называется *фосфоресценцией*. Обычно это  $T \rightarrow S_0$ -переходы. Данный процесс является запрещенным (запрет по мультиплетности). Запрет может частично сниматься в результате спин-орбитальных взаимодействий. Время жизни фосфоресценции больше, чем флуоресценции (в связи с наличием запрета). Однако временные границы между этими двумя видами люминесценции отсутствуют. Способ получения электронно-возбужденных состояний может характеризовать либо источник возбуждения, либо механизм возникновения люминесценции.

По механизму возникновения люминесценции выделяют свечение дискретных центров и рекомбинационную люминесценцию. В первом случае поглощающие и излучающие центры – одни и те же частицы (атомы, ионы, молекулы). Этот вид люминесценции встречается у органических веществ, их растворов и неорганических соединений. При рекомбинационной люминесценции акты поглощения и люминесценции разделены не только во времени, но и в пространстве. Такая люминесценция наблюдается, например, при рекомбинации электронов и дырок в неорганических кристаллах (кристаллофосфорах), радикалов или ионов в газах и жидкостях.

В соответствии с типом источника выделяют *фотолюминесценцию* (источник возбуждения – свет), *электролюминесценцию* (электрическое поле), *рентгенолюминесценцию* (рентгеновские лучи), *хемилюминесценцию* (химические реакции).

Люминесценцию также можно классифицировать по механизму преобразования энергии (механизм элементарных процессов): резонансная, спонтанная, вынужденная, рекомбинационная.

Твердые и жидкие вещества, способные люминесцировать под действием различного рода возбуждений, называются *люминофорами* (от латинского *lumen* – свет и греческого *phoros* – несущий), которые также можно классифицировать по типу возбуждения и химической природе. По типу возбуждения различают: фотолюминофоры, рентгенолюминофоры, радиолюминофоры, катодолюминофоры, электролюминофоры и смешанные типы (например,  $\text{ZnS} \cdot \text{Cu}$  является фото-, катодо- и электролюминофором). По химической природе различают: органические – *органолюминофоры*, неорганические – *фосфоры*. Фосфоры, имеющие кристаллическую структуру, называются *кристаллофосфорами*.

Наибольшее значение имеет фотолюминесценция. Фотолюминесценцию можно характеризовать спектрами люминесценции, поляризацией, квантовым выходом, максимумом спектра фотолюминесценции и др.



## 2.6. Систематика молекул по спектрально-люминесцентным свойствам

Классификационным признаком молекул являются квантово-механические характеристики атомных и молекулярных орбиталей, формирующих внешнюю электронную оболочку молекулы:

- симметрия;
- пространственная ориентация;
- связывающий, несвязывающий или разрыхляющий характер;
- относительное положение;
- делокализация или относительная локализация.

Свойства внешней электронной оболочки молекулы полностью определяют все специфические характеристики молекул аналогично тому, как электронная оболочка атома определяет свойства химических элементов.

При таком выборе классификационного признака устанавливается непосредственная *связь между Периодической системой Менделеева и систематикой молекул.*

Молекулы класса  $\sigma\pi$  характеризуются большой разностью энергий  $S$ - и  $T$ -состояний (величиной  $S$ – $T$ -расщепления) –  $8000$ – $10000\text{ см}^{-1}$  (обратные сантиметры – единицы измерения энергии, используемые в спектроскопии). Энергия возбужденных состояний этих молекул уменьшается с ростом цепи сопряжения. Большинство из них обладает как флуоресценцией, так и долгоживущей ( $1$ – $10\text{ с}$ ) фосфоресценцией. Колебательная структура спектров определяется в основном колебаниями ароматической системы.

Молекулы  $\sigma\pi l$ - и  $\sigma\pi v$ -классов обладают более длинноволновыми полосами поглощения и люминесценции, чем молекулы предыдущего класса. Величина  $S$ – $T$ -расщепления для них несколько понижена ( $4000$ – $8000\text{ см}^{-1}$ ), а выход фосфоресценции повышен по сравнению с молекулами класса  $\sigma\pi$ . Большинство этих молекул имеет слабозапрещенную колебательную структуру (малоинтенсивные колебательные переходы). Все эти особенности объясняются вкладом  $l\pi^*$ - и  $\pi v^*$ -конфигураций в возбужденные состояния.

Молекулы класса  $\sigma\pi l$  отличаются большим разнообразием свойств, которые обусловлены наличием триплетных  $n,\pi^*$ - и  $\pi,\pi^*$ -состояний и различным их относительным положением. Наиболее отчетливо это видно на примере ароматических карбонильных соединений. Для молекул с энергетической последовательностью состояний  $S_0$ ,  $T_{n,\pi^*}$ ,  $T_{\pi,\pi^*}$ ,  $S_{n,\pi^*}$ ,  $S_{\pi,\pi^*}$  (рис. 2.11, схема II) (например молекула 9,10-антрахинона) наблюдается только короткоживущая фосфоресценция из триплетного состояния  $n,\pi^*$ -типа. Ее колебательная структура обусловлена колебаниями с характерными частотами колебаний группы  $>C=O$  в соответствии с природой низшего триплетного состояния  $n,\pi^*$ -типа. Для молекул с расположением состояний

$S_0$ ,  $T_{\pi,\pi}^*$ ,  $T_{n,\pi}^*$ ,  $S_{n,\pi}^*$ ,  $S_{\pi,\pi}^*$  (рис. 2.11, схема III) (например молекула 1,4-антрахинона) наблюдается только долгоживущая (0,1–1 с) фосфоресценция. В квазилинейчатом спектре (полученном при 77 К в углеводородной матрице) преобладают частоты ароматической системы в соответствии с природой низшего триплетного состояния  $\pi,\pi^*$ -типа. В случае молекул с расположением  $S_0$ ,  $T_{\pi,\pi}^*$ ,  $T_{n,\pi}^*$ ,  $S_{\pi,\pi}^*$ ,  $S_{n,\pi}^*$  (рис. 2.11, схема IV) например, в случае молекулы мезобензантрона в гексановом растворе, наблюдается также только фосфоресценция из  $T_{\pi,\pi}^*$ -состояния. Для молекул с расположением состояний  $S_0$ ,  $T_{\pi,\pi}^*$ ,  $S_{\pi,\pi}^*$ ,  $T_{n,\pi}^*$ ,  $S_{n,\pi}^*$  (рис. 2.11, схема V) наблюдаются как флуоресценция, так и фосфоресценция, например для бензантрона в этиловом спирте.

Свойства молекул класса  $\sigma\pi n$  подобны свойствам молекул класса  $\sigma\pi\pi$ . Введение в электронную оболочку молекулы  $l$ -орбиталей приводит к изменению относительного расположения орбиталей. Например, в ряду ксантон, акридон, ксантион происходит понижение энергии  $\pi l, \pi^*$ -состояний и повышение энергии  $n, \pi^*$ -состояний вплоть до изменения их относительного положения состояний.

Основная закономерность в спектрально-люминесцентных свойствах молекул состоит в следующем: *спектрально-люминесцентные свойства молекул определяются относительным положением низших уровней энергии электронно-возбужденных состояний различной орбитальной природы и мультиплетности*, которое может изменяться под влиянием ряда структурных факторов и межмолекулярного взаимодействия. Из пяти низших электронных состояний  $S_0$ ,  $T_{n\pi}^*$ ,  $S_{n\pi}^*$ ,  $T_{\pi\pi}^*$ ,  $S_{\pi\pi}^*$  можно построить шесть типов их относительного расположения. При построении этих электронных структур необходимо учитывать то, что триплетное состояние расположено ниже соответствующего ему синглетного. Однако экспериментально установлено существование лишь пяти типов относительного расположения  $n, \pi^*$ - и  $\pi, \pi^*$ -состояний (рис. 2.11), что связано с зависимостью  $S$ – $T$ -расщепления (разностью энергий  $S$ - и  $T$ -состояний одной орбитальной природы) от орбитальной природы состояний. Энергия триплетного возбужденного состояния связана с энергией соответствующего синглетного состояния соотношением  $E_{T(i-j)} = E_{S(i-j)} - 2A_{ij}$ .

Величина синглет-триплетного расщепления ( $E_{S(i-j)} - E_{T(i-j)}$ ) равна удвоенному значению интеграла обменного взаимодействия электронов  $A_{ij}$ , находящихся на орбиталях  $\phi_i$  и  $\phi_j$ , между которыми происходит электронный переход:

$$A_{ij} = \iint \phi_i(1)\phi_j(1)\frac{e^2}{r}\phi_i(2)\phi_j(2)d\tau_1d\tau_2,$$

где  $\phi_i$  и  $\phi_j$  – волновые функции орбиталей;  $r$  – расстояние между электронами. Интегрирование осуществляется по элементам объема  $\tau$ , занятого первым (1) и вторым (2) электронами.

Таким образом, величина  $S-T$ -расщепления зависит от перекрывания орбиталей  $\phi_i$  и  $\phi_j$ . Отсюда следует, что синглет-триплетное расщепление  $\pi, \pi^*$ -состояний больше, чем  $n, \pi^*$ -состояний, так как  $n$ - и  $\pi$ -орбитали в отличие от  $\pi$ - и  $\pi^*$ -орбиталей перекрываются незначительно в силу их пространственной ориентации. В среднем  $S-T$ -расщепление для  $n, \pi^*$ -состояний колеблется около  $2000-4000 \text{ см}^{-1}$ , а для  $\pi, \pi^*$ -состояний –  $6000-12000 \text{ см}^{-1}$ .

Величины  $S-T$ -расщепления для состояний  $\pi l, \pi^*$ ;  $\pi, \nu \pi^*$ ;  $\pi l, \nu \pi^*$  имеют промежуточное значение (по сравнению с  $n, \pi^*$  и  $\pi, \pi^*$ ) и уменьшаются с возрастанием вклада  $l\pi^*$ - и  $\nu\pi$ -конфигураций. Таким образом, величина  $S-T$ -расщепления является важной характеристикой орбитальной природы состояний, и по ее значениям можно судить об электронном строении молекул.

Шестой тип (VI) относительного расположения  $n, \pi^*$ - и  $\pi, \pi^*$ -состояний маловероятен, так как при этом величина  $S-T$ -расщепления  $n, \pi^*$ -состояния должна быть несколько больше таковой для  $\pi, \pi^*$ -состояния.

Молекулы I типа обладают как флуоресценцией, так и короткоживущей фосфоресценцией из  $n, \pi^*$ -состояний; молекулы II типа имеют только короткоживущую фосфоресценцию из триплетного состояния  $n, \pi^*$ -типа; молекулы III и IV типов – только долгоживущую фосфоресценцию из триплетного состояния  $\pi, \pi^*$ -типа; молекулы V типа обладают как флуоресценцией, так и долгоживущей фосфоресценцией из  $\pi, \pi^*$ -состояний. Отличие молекул III и IV типов состоит в том, что в молекулах IV типа  $S_{n, \pi^*}$ -состояние расположено выше  $S_{\pi, \pi^*}$ -состояния и полоса  $n, \pi^*$ -перехода в спектрах поглощения обычно маскируется интенсивной полосой  $\pi, \pi^*$ -перехода. Некоторые молекулы могут принадлежать к разным спектрально-люминесцентным типам в зависимости от окружения, так как межмолекулярные взаимодействия могут изменять энергию уровней в различной степени (в зависимости от их орбитальной природы) и, как следствие этого, изменять относительное положение состояний (инверсия уровней). Так, молекулы IV спектрально-люминесцентного типа при возникновении даже слабой водородной связи могут перейти в V спектрально-люминесцентный тип. Молекулы же III типа могут перейти в V тип (с флуоресценцией) только в случае сильных протонно-донорных растворителей (кислот). Еще следует отметить, что молекулы II, III и IV типов, характеризующихся двумя низшими триплетами, не флуоресцируют.

На основе орбитальной классификации молекул и основных пяти групп молекул ([рис. 2.11](#)) профессором Д. Н. Шигориным построена классификация молекул по спектрально-люминесцентным свойствам ([табл. 2.2](#)). Классы молекул (горизонтальные ряды) различаются орбитальной природой состояний. Группы молекул (вертикальные столбцы) различаются относительным положением уровней энергии электронных состояний молекул аналогично тому, как мы уже рассматривали на [рис. 2.11](#).

Представленный на этом рисунке класс молекул ( $\sigma\pi n$ ) приведен в [табл. 2.2](#) как V класс молекул.

Молекулы классов I –  $\sigma\pi$ ; II –  $\sigma\pi\nu$ ; III –  $\sigma\pi l$ ; IV –  $\sigma\pi l\nu$  могут принадлежать только V спектрально-люминесцентной группе (пятый столбец в [табл. 2.2](#)), так как для этих классов не существует возможных вариаций относительного положения уровней. Молекулы классов V –  $\sigma\pi n$ ; VI –  $\sigma\pi n\nu$ ; VII –  $\sigma\pi ln$ ; VIII –  $\sigma\pi ln\nu$  могут принадлежать к любой из пяти спектрально-люминесцентных групп (от первого до пятого столбца в [табл. 2.2](#)) в соответствии с относительным положением их уровней. Молекулы, относящиеся к одной спектрально-люминесцентной группе, обладают подобными, но количественно отличающимися свойствами, подобно тому, как изменяются свойства атомов в группах Периодической системы Менделеева.

Таблица 2.2

Систематика молекул по спектрально-люминесцентным свойствам:  
органические молекулы

Основные классы		Группы				
		I	II	III	IV	V
1	$\sigma\pi$	—	—	—	—	$S_{\pi,\pi}^*$ $T_{\pi,\pi}^*$ $S_0$
2	$\sigma\pi\nu$	—	—	—	—	$S_{\pi,\nu\pi}^*$ $T_{\pi,\nu\pi}^*$ $S_0$
3	$\sigma\pi l$	—	—	—	—	$S_{\pi l,\pi}^*$ $T_{\pi l,\pi}^*$ $S_0$
4	$\sigma\pi l\nu$	—	—	—	—	$S_{\pi l,\nu\pi}^*$ $T_{\pi l,\nu\pi}^*$ $S_0$
5	$\sigma\pi n$	$S_{\pi,\pi}^*$ $T_{\pi,\pi}^*$ $S_{n,\pi}^*$ $T_{n,\pi}^*$ $S_0$	$S_{\pi,\pi}^*$ $S_{n,\pi}^*$ $T_{\pi,\pi}^*$ $T_{n,\pi}^*$ $S_0$	$S_{\pi,\pi}^*$ $S_{n,\pi}^*$ $T_{n,\pi}^*$ $T_{\pi,\pi}^*$ $S_0$	$S_{n,\pi}^*$ $S_{\pi,\pi}^*$ $T_{n,\pi}^*$ $T_{\pi,\pi}^*$ $S_0$	$S_{n,\pi}^*$ $T_{n,\pi}^*$ $S_{\pi,\pi}^*$ $T_{\pi,\pi}^*$ $S_0$
6	$\sigma\pi n\nu$	$S_{\pi,\nu\pi}^*$ $T_{\pi,\nu\pi}^*$ $S_{n,\nu\pi}^*$ $T_{n,\nu\pi}^*$ $S_0$	$S_{\pi,\nu\pi}^*$ $S_{n,\nu\pi}^*$ $T_{\pi,\nu\pi}^*$ $T_{n,\nu\pi}^*$ $S_0$	$S_{\pi,\nu\pi}^*$ $S_{n,\nu\pi}^*$ $T_{n,\nu\pi}^*$ $T_{\pi,\nu\pi}^*$ $S_0$	$S_{n,\nu\pi}^*$ $S_{\pi,\nu\pi}^*$ $T_{n,\nu\pi}^*$ $T_{\pi,\nu\pi}^*$ $S_0$	$S_{n,\nu\pi}^*$ $T_{n,\nu\pi}^*$ $S_{\pi,\nu\pi}^*$ $T_{\pi,\nu\pi}^*$ $S_0$
7	$\sigma\pi n l$	$S_{\pi l,\pi}^*$ $T_{\pi l,\pi}^*$ $S_{n,\pi}^*$ $T_{n,\pi}^*$ $S_0$	$S_{\pi l,\pi}^*$ $S_{n,\pi}^*$ $T_{\pi l,\pi}^*$ $T_{n,\pi}^*$ $S_0$	$S_{\pi l,\pi}^*$ $S_{n,\pi}^*$ $T_{n,\pi}^*$ $T_{\pi l,\pi}^*$ $S_0$	$S_{n,\pi}^*$ $S_{\pi l,\pi}^*$ $T_{n,\pi}^*$ $T_{\pi l,\pi}^*$ $S_0$	$S_{n,\pi}^*$ $T_{n,\pi}^*$ $S_{\pi l,\pi}^*$ $T_{\pi l,\pi}^*$ $S_0$
8	$\sigma\pi n l\nu$	$S_{\pi l,\nu\pi}^*$ $T_{\pi l,\nu\pi}^*$ $S_{n,\nu\pi}^*$ $T_{n,\nu\pi}^*$ $S_0$	$S_{\pi l,\nu\pi}^*$ $S_{n,\nu\pi}^*$ $T_{\pi l,\nu\pi}^*$ $T_{n,\nu\pi}^*$ $S_0$	$S_{\pi l,\nu\pi}^*$ $S_{n,\nu\pi}^*$ $T_{n,\nu\pi}^*$ $T_{\pi l,\nu\pi}^*$ $S_0$	$S_{n,\nu\pi}^*$ $S_{\pi l,\nu\pi}^*$ $T_{n,\nu\pi}^*$ $T_{\pi l,\nu\pi}^*$ $S_0$	$S_{n,\nu\pi}^*$ $T_{n,\nu\pi}^*$ $S_{\pi l,\nu\pi}^*$ $T_{\pi l,\nu\pi}^*$ $S_0$

Эти различия связаны с отличием свойств  $\pi$ -орбиталей молекулярной системы и  $l$ - и  $\nu$ -орбиталей гетероатомов, вклад которых в возбужденные состояния определяется их положением в Периодической системе Менделеева.

Таким образом, молекулы разных классов, расположенные в одной группе систематики, имеют подобные электронные структуры и сходные спектрально-люминесцентные свойства.

Именно только учет орбитальной природы состояний, связанной прежде всего с изменением природы гетероатома, позволяет объяснить и предсказать количественные изменения спектрально-люминесцентных характеристик (времена жизни, соотношения выходов фосфоресценции и флуоресценции, колебательная структура спектров, распределение интенсивностей в полосе поглощения или испускания, поляризация) разных классов молекул. Переход от одного спектрально-люминесцентного класса к другому внутри данного класса молекул (горизонтальные ряды) осуществляется при изменении длины цепи сопряженных связей, последовательности химических связей атомов (групп) и межмолекулярного взаимодействия. Для всех 8 классов молекул возможно существование 24 основных электронных структур, характеризующихся относительным положением нижних уровней энергии электронно-возбужденных состояний различной орбитальной природы и мультиплетности ([табл. 2.2](#)).

Систематика дает возможность выделить люминесцентные группы молекул, наиболее перспективные для практического применения в качестве люминофоров, красителей, активных сред. Поскольку такие соединения должны обладать большим выходом флуоресценции, они могут относиться только к V спектрально-люминесцентной группе.

Квантовый выход флуоресценции молекул этой группы максимален для представителей  $\sigma\pi$ -,  $\sigma\pi l$ -,  $\sigma\pi l n$ -классов и возрастает с ростом длины цепи сопряжения и вклада конфигураций с переносом заряда  $l\pi^*$  или  $\pi\nu$ .

Максимальную возможность управления свойствами можно реализовать в молекулах классов  $\sigma\pi l n$  и  $\sigma\pi l \nu$ , обладающих наибольшим выбором орбиталей различной природы. Действительно, важнейшие красители, люминофоры, соединения, используемые в электронике, биологически активные соединения принадлежат к этим классам молекул. Соединения этих классов, принадлежащие V группе, могут являться эмиттерами в биолюминесцентных процессах, которые характеризуются высокими выходами люминесценции при обычных температурах.

Таким образом, классификационным признаком молекул являются квантово-механические характеристики атомных и молекулярных орбиталей, формирующих внешнюю электронную оболочку молекулы: симметрия; пространственная ориентация; связывающий, несвязывающий или разрыхляющий характер; относительное положение; делокализация или относительная локализация. Свойства этой оболочки полностью определяют все специфические характеристики молекул, подобно тому, как электронная оболочка атома определяет свойства химических элементов. При таком выборе классификационного признака устанавливается непосредственная связь между Периодической системой Менделеева и систематикой молекул.



## 2.7. Фотолюминесценция. Фотолюминесценция биологических молекул и альтернативные пути растраты энергии возбуждения. Основные параметры люминесценции

Из всех видов люминесценции биологических молекул наиболее важное значение имеет фотолюминесценция. Процессы, следующие за поглощением света, могут происходить с излучением, но существуют и альтернативные пути растраты энергии возбуждения. Например, синглет-триплетная конверсия, которая происходит между состояниями одинаковой и разной орбитальной природы, имеет свои особенности. Константы скорости излучательных переходов  $S \rightarrow S_0$ ,  $T \rightarrow S_0$  связаны с силой осциллятора  $f$  соотношением

$$K = c \nu^2 f,$$

где  $\nu$  – частота соответствующего электронного перехода;  $c = 1,5$ .

Радиационное время жизни  $\tau_0$  связано с константой скорости перехода  $k$  выражением  $\tau_0 = 1/k$ . Величины  $\tau_0$  составляют  $\sim 10^{-7}$ – $10^{-8}$  с в случае состояний, формирующихся в результате разрешенных переходов (например,  $S_{\pi,\pi}^*$ -состояния и соответствующие им синглет-синглетные  $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходы), и возрастают до  $10^{-6}$  с для запрещенных по симметрии переходов. Пример запрещенных по симметрии переходов – синглет-синглетные  $n \rightarrow \pi^*$ -переходы. Их сила осциллятора мала и значения радиационных времен жизни  $S_{n,\pi}^*$ -состояний достигают  $\sim 10^{-6}$  с.

Электронно-возбужденные состояния являются собственными состояниями не полного гамильтониана ( $H = H_0 + \hat{V}$ ) молекулы, а только гамильтониана адиабатического приближения  $H_0$ , из которого исключен оператор  $\hat{V}$  – неадиабатичности и спин-орбитального взаимодействия. Такие состояния возникают в первый момент после поглощения света или заселения этого состояния каким-либо другим способом. Затем под действием оператора неадиабатичности и спин-орбитального взаимодействия они эволюционируют, чем и определяются основные характеристики спектров люминесценции. Результатом этих взаимодействий являются безызлучательные переходы: между состояниями одинаковой мультиплетности – *внутренняя конверсия* (определяемые оператором неадиабатичности) – и разной мультиплетности – *интеркомбинационная конверсия* (определяемые оператором спин-орбитального взаимодействия). Под действием этих операторов происходит также смешивание состояний, что, например, приводит к разрешению запрещенных переходов. Вклад примешиваемых конфигураций обычно очень мал, но эффекты, к которым он приводит, значительны. Таким образом, внутренняя конверсия – это быстрая релаксация на самый нижний колебательный уровень состояния  $S_1$ .



Поскольку типичные времена затухания флуоресценции близки к  $10^{-8}$  с, то внутренняя конверсия обычно полностью заканчивается до процесса испускания, следовательно, испускание флуоресценции чаще всего осуществляется из термически равновесного возбужденного состояния. Аналогично поглощению обратный переход электронов на самый нижний электронный уровень также приводит к колебательно-возбужденному состоянию. Спектр поглощения молекулы отражает колебательную структуру возбужденных электронных состояний, а спектр испускания – колебательную структуру основного электронного состояния. В большинстве случаев электронное возбуждение не сильно изменяет расположение колебательных уровней энергии. В результате этого колебательные структуры, проявляющиеся в спектрах поглощения и испускания, сходны.

Переходы между состояниями различной мультиплетности запрещены (запрет по мультиплетности), но они могут разрешаться вследствие спин-орбитальных взаимодействий, которые представляют собой взаимодействия между спиновым и орбитальным магнитным моментами электрона в электростатическом поле ядра. Благодаря спин-орбитальному взаимодействию возникает сила, стремящаяся изменить направление спинового момента электрона. Вычисление оператора спин-орбитального взаимодействия позволяет оценить взаимодействия между состояниями одинаковой и разной орбитальной природы и объяснить различную природу люминесценции молекул. Интенсивности  $T$ – $S$ -переходов определяются величинами сил осцилляторов  $f$  «примешивающихся» конфигураций.

Для молекул класса  $\sigma\pi$  из нижних  $T_{\pi\pi}^*$ -состояний наблюдается длительная фосфоресценция  $\tau_0 = 1$ – $10$  с при значительной силе осциллятора, определяющей интенсивность фосфоресценции:  $f(S_0 \leftarrow S_{\pi,\pi}^*) \approx 0,1$ – $1$ .

Для молекул класса  $\sigma\pi l$  радиационные времена жизни  $\tau_0$  низших триплетных состояний следующие:  $\tau_0$  для триплетного состояния  $n,\pi^*$ -типа равно  $10^{-2}$ – $10^{-3}$  с, для  $\pi,\pi^*$ -типа  $0,1$ – $5$  с. Силы осцилляторов «примешивающихся» синглетных конфигураций  $f(S_0 \leftarrow S_{\pi,\pi}^*)$ , вносящих разрешенность в этот излучательный перенос, равны  $0,1$ – $0,5$ ;  $f(S_0 \leftarrow S_{n,\pi}^*) = 10^{-2}$ – $10^{-3}$ .

В молекулах классов  $\sigma\pi l$ ,  $\sigma\pi v$ ,  $\sigma\pi nl$  и  $\sigma\pi nv$  времена жизни триплетных состояний зависят от порядкового номера элемента, атомы которого участвуют своими  $l$ - или  $v$ -орбиталями в формировании электронных состояний. С его возрастанием время жизни триплетного состояния падает. Например, в ряду галоидпроизводных антрахинона при переходе от  $F$  к  $I$  в качестве заместителя время жизни низшего триплетного состояния  $\pi l,\pi^*$ -типа уменьшается. Кроме того, на величину времени жизни состояния влияет и его орбитальная природа. Так, у некоторых ароматических аминов время жизни фосфоресценции ( $\pi l,\pi^*$ -типа) имеет промежуточное значение между временами жизни  $\pi,\pi^*$ - и  $n,\pi^*$ -фосфоресценции углеводов. Таким образом, величина спин-орбитального взаимодействия между состояниями разной орбитальной природы ( $T_{n,\pi}^*$  и  $S_{\pi,\pi}^*$  или  $S_{n,\pi}^*$  и  $T_{\pi,\pi}^*$ ) более чем на

порядок превышает величину спин-орбитального взаимодействия состояний одинаковой орбитальной природы ( $T_{n,\pi}^*$  и  $S_{n,\pi}^*$  или  $T_{\pi,\pi}^*$  и  $S_{\pi,\pi}^*$ ).

Рассчитанные величины констант  $S-T$ -конверсии (интеркомбинационная) следующие:

$$K_1 (S_{\pi,\pi}^* \rightarrow T_{\pi,\pi}^* \text{ или } S_{n,\pi}^* \rightarrow T_{n,\pi}^*) \approx 10^6 - 10^8 \text{ с}^{-1},$$

$$K_2 (S_{\pi,\pi}^* \rightarrow T_{n,\pi}^* \text{ или } S_{n,\pi}^* \rightarrow T_{\pi,\pi}^*) \approx 10^{10} - 10^{11} \text{ с}^{-1}.$$

Указанная разница в константах скоростей  $S-T$ -конверсии определяется большими различиями величин спин-орбитального взаимодействия соответствующих состояний. Эту разницу можно представить в виде правил отбора для  $S-T$ -переходов:

разрешенные  $S-T$ -переходы:  $n,\pi^* \longleftrightarrow \pi,\pi^*$ ,

запрещенные  $S-T$ -переходы:  $n,\pi^* \longleftrightarrow n,\pi^*$ ,

$\pi,\pi^* \longleftrightarrow \pi,\pi^*$ .

То, что  $S-T$ -переходы между состояниями разной орбитальной природы разрешены, отмечено первый раз в 1963 году (эмпирическое правило Эль-Саэда).

Величины констант внутренней конверсии ( $S-S$ - или  $T-T$ -переходы) следующие:

$$K_3 (S_{n,\pi}^* \rightarrow S_{\pi,\pi}^*; S_{\pi,\pi}^* \rightarrow S_{n,\pi}^* \text{ или } T_{n,\pi}^* \rightarrow T_{\pi,\pi}^*;$$

$$T_{\pi,\pi}^* \rightarrow T_{n,\pi}^*) \approx 10^{11} \text{ с}^{-1}.$$

Константы скоростей излучательных переходов имеют следующие значения:

$$K_4 (S_{n,\pi}^* \rightarrow S_0) \approx 10^6 \text{ с}^{-1},$$

$$K_5 (S_{\pi,\pi}^* \rightarrow S_0) \approx 10^7 - 10^{10} \text{ с}^{-1},$$

$$K_6 (T_{n,\pi}^* \rightarrow S_0) \approx 10^2 - 10^4 \text{ с}^{-1},$$

$$K_7 (T_{\pi,\pi}^* \rightarrow S_0) \approx 10^{-1} - 10 \text{ с}^{-1}.$$

Зная константу скорости  $K$  излучательных и безызлучательных переходов, можно посчитать времена жизни  $\tau_0$  возбужденных состояний, с которых происходят переходы, зная, что  $\tau_0 = 1/K$ :

$$(\tau_0)_1 (S_{\pi,\pi}^* \rightarrow T_{\pi,\pi}^* \text{ или } S_{n,\pi}^* \rightarrow T_{n,\pi}^*) \approx 10^{-6} - 10^{-8} \text{ с},$$

$$(\tau_0)_2 (S_{\pi,\pi}^* \rightarrow T_{n,\pi}^* \text{ или } S_{n,\pi}^* \rightarrow T_{\pi,\pi}^*) \approx 10^{-10} - 10^{-11} \text{ с}^1,$$

$$(\tau_0)_3 (S_{n,\pi}^* \rightarrow S_{\pi,\pi}^*; S_{\pi,\pi}^* \rightarrow S_{n,\pi}^* \text{ или } T_{n,\pi}^* \rightarrow T_{\pi,\pi}^*;$$

$$T_{\pi,\pi}^* \rightarrow T_{n,\pi}^*) \approx 10^{-11} \text{ с}^1,$$

$$(\tau_0)_4 (S_{n,\pi}^* \rightarrow S_0) \approx 10^{-6} \text{ с}^1,$$

$$(\tau_0)_5 (S_{\pi,\pi}^* \rightarrow S_0) \approx 10^{-7} - 10^{-10} \text{ с}^1,$$

$$(\tau_0)_6 (T_{n,\pi}^* \rightarrow S_0) \approx 10^{-2} - 10^{-4} \text{ с}^1,$$

$$(\tau_0)_7 (T_{\pi,\pi}^* \rightarrow S_0) \approx 10 - 10^{-1} \text{ с}^1.$$

В соответствии с этими данными на [рис. 2.11](#) и в [табл. 2.2](#) для каждого спектрально-люминесцентного типа молекул указаны волнистой и прямой линиями наиболее вероятные безызлучательные и излучательные переходы – пути дезактивации возбужденных состояний.

## 2.8. Флуоресценция: основные характеристики и параметры

*Флуоресценция* – это испускание, происходящее при возвращении спаренного электрона на более низкую орбиталь. Такие переходы квантовомеханически «разрешены», а типичные величины скоростей испускания для них  $\sim 10^8 \text{ с}^{-1}$ . Высокие значения скоростей испускания приводят к временам затухания флуоресценции  $\sim 10^{-8} \text{ с}$  (10 нс). *Время жизни* – это средний период времени, в течение которого флуорофор находится в возбужденном состоянии.

Флуоресцентные спектральные данные обычно представляют в виде спектров испускания. Спектр испускания флуоресценции – это зависимость интенсивности флуоресценции от длин волн (в нанометрах) или волновых чисел (в  $\text{см}^{-1}$ ). При строгих количественных измерениях спектры флуоресценции изображают одним из трех способов:

1) по оси ординат откладывают число квантов, испускаемых за секунду в расчете на единичный интервал длин волн при данной длине волны ( $dQ/d\lambda$ ), а по оси абсцисс – длину волны;

2) по оси ординат откладывают число квантов, испускаемых за секунду в расчете на единичный интервал частот при данной частоте ( $dQ/d\nu$ ), а по оси абсцисс – частоту (площадь под кривой пропорциональна полной скорости испускания флуоресценции всех длин волн, измеряемой в единицах, пропорциональных числу квантов за единицу времени);

3) по оси ординат откладывают энергию, испускаемую за секунду в единичном интервале длин волн ( $dE/d\lambda$ ), а по оси абсцисс – длину волны. (площадь под кривой дает полную энергию, испускаемую за единицу времени).

Два типичных спектра испускания флуоресценции изображены на [рис. 2.21](#). Спектры испускания сильно изменяются и зависят как от химической структуры флуорофора, так и от растворителя, в котором флуорофор растворен. Спектры некоторых соединений, таких как перилен, имеют четкую структуру, обусловленную отдельными колебательными уровнями энергии основного и возбужденного состояний. Колебательная структура спектров испускания определяется колебательными подуровнями основного, а не возбужденного электронного состояния.

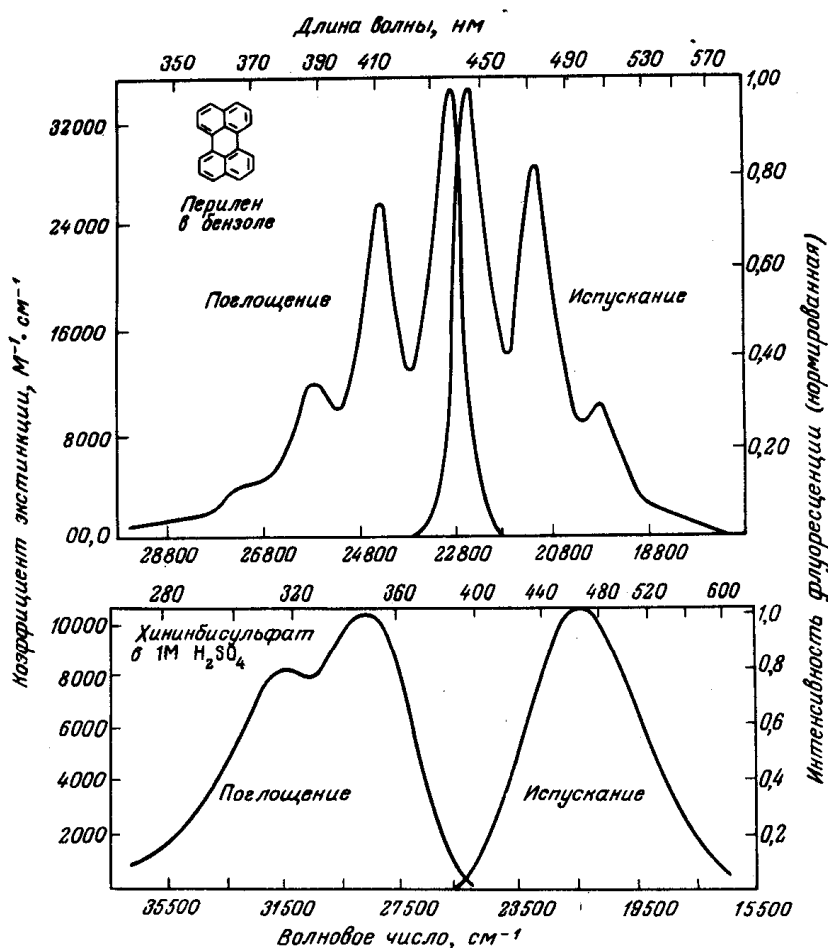


Рис. 2.21. Спектры поглощения и испускания флуоресценции перилена и хинина

Из [рис. 2.21](#) видно, что энергетическая щель между различными колебательными уровнями энергии видна из спектра испускания перилена. Отдельные максимумы испускания (а, следовательно, и колебательные уровни энергии) отстоят друг от друга примерно на  $1500\text{ см}^{-1}$ .

### 2.8.1. Стоксов сдвиг.

Как правило, всегда наблюдается сдвиг испускания относительно поглощения в сторону больших длин волн, т. е. потеря энергии. Это явление впервые наблюдал Стокс в 1852 году в Кембридже. Одной из основных причин возникновения стоксова сдвига является быстрая релаксация на нижний колебательный уровень состояния  $S_1$ . К тому же обычно происходит переход на возбужденные колебательные уровни состояния  $S_0$  ([рис. 2.22](#)), что приводит к дополнительной потере колебательной энергии. Вдобавок к этому стоксов сдвиг может быть еще более увеличен благодаря влияниям растворителя на флуорофоры и реакциям в возбужденных состояниях.

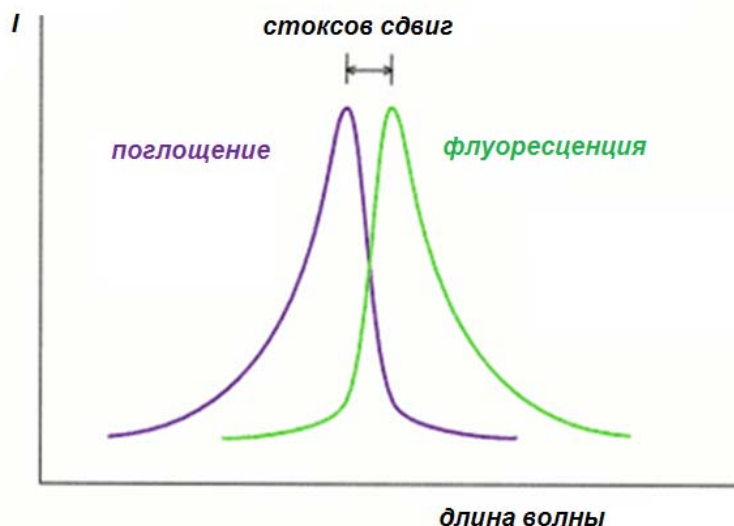


Рис. 2.22. Стоксов сдвиг

### 2.8.2. Независимость спектра испускания от длины волны возбуждения.

Спектр испускания флуоресценции обычно не зависит от длины волны возбуждения. При возбуждении на высшие электронные и колебательные уровни избыток энергии быстро расходуется, переводя флуорофор на самый нижний колебательный уровень состояния  $S_1$ . Эта релаксация происходит за время порядка  $10^{-12}$  с и является, по-видимому, результатом сильного перекрывания множества состояний с примерно равными энергиями. Благодаря такой быстрой релаксации длина волны возбуждения обычно не влияет на спектр испускания. График зависимости  $\epsilon$  от длины волны или

частоты возбуждающего света называется истинным спектром возбуждения флуоресценции. Для большинства веществ в растворах квантовый выход флуоресценции ( $\phi_f$ ) не зависит от частоты возбуждающего света – закон Вавилова. Таким образом, истинный спектр возбуждения флуоресценции разбавленного раствора, содержащего одно поглощающее вещество, будет пропорционален коэффициенту поглощения, т. е. он является просто спектром поглощения этого вещества (рис. 2.23). Если вид спектра флуоресценции меняется с изменением длины волны возбуждающего света, это может быть следствием того, что в смеси содержится несколько флуоресцирующих компонентов.

Существуют исключения (например, азулен), когда испускание может происходить как из  $S_2$ -, так и из  $S_1$ -состояния. При стоксовом возбуждении монохроматическим светом (спектральной линией) в любом месте полосы поглощения испускается вся полоса флуоресценции целиком с неизменным распределением в ней интенсивности. Постоянство спектра испускания при изменении частоты возбуждающего монохроматического света в широких пределах приводит к важному заключению о механизме этого внутримолекулярного процесса. При поглощении монохроматического излучения возбуждается только один из электронно-колебательных уровней энергии. Если при этом испускается целый набор фотонов, то это значит, что между актом поглощения и актом испускания происходит перераспределение энергии между колебательными степенями свободы молекулы, формирующее состояние, исходное для испускания. Такая нивелировка различных состояний возбуждения является внутренним свойством молекулы и не вызвана взаимодействием молекулы с окружающей средой.

### 2.8.3. Правило зеркальной симметрии.

Обычно спектр испускания флуоресценции представляет собой зеркальное отражение спектра поглощения, точнее, того поглощения, которое соответствует переходу из  $S_0$  в  $S_1$  (рис. 2.23). Симметричная природа спектров, определяющаяся тем, что и поглощение, и испускание обусловлены одними и теми же переходами, а также сходством колебательных энергетических уровней состояний  $S_0$  и  $S_1$ . Для многих молекул различное распределение электронов в состояниях  $S_0$  и  $S_1$  существенно не влияет на эти уровни энергии.

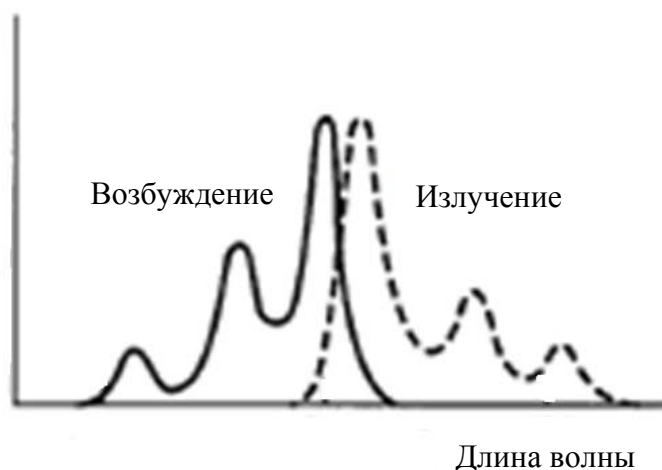


Рис. 2.23. Спектры поглощения и флуоресценции (приблизительно зеркально симметричные)

#### 2.8.4. Принцип Франка – Кондона.

Согласно принципу Франка – Кондона все электронные переходы происходят без изменения межъядерного расстояния. Электронные переходы являются настолько быстрыми ( $10^{-14}$ – $10^{-15}$  с) по сравнению с движением ядер в молекуле ( $10^{-12}$ – $10^{-13}$  с), что за время электронного перехода относительное расположение ядер и их кинетическая энергия практически не изменяются. Отсюда следует, что переход можно представить вертикальной линией, соединяющей различные поверхности потенциальной энергии, причем наиболее вероятным окажется переход на тот колебательный уровень, который имеет то же значение межъядерного расстояния в точке поворота колебаний. В результате если данная вероятность перехода (фактор Франка – Кондона) между нулевым и вторым колебательными уровнями максимальна при поглощении, соответствующий переход будет наиболее вероятен также и в испускании ([рис. 2.24](#)).



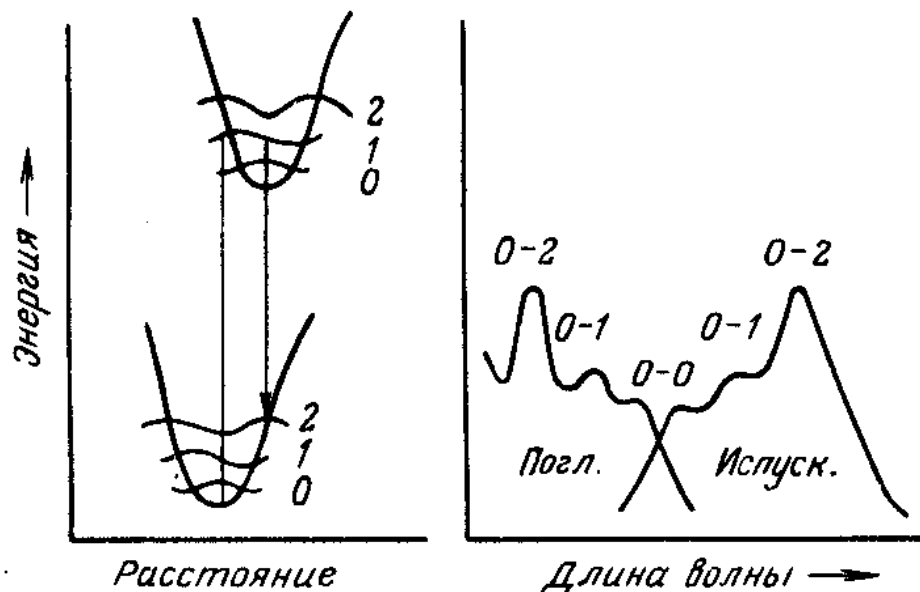


Рис. 2.24. Правило зеркальной симметрии и факторы Франка – Кондона

Несмотря на то, что правило зеркальной симметрии часто выполняется, из него существует множество исключений ([рис. 2.25](#)). Такое отклонение от правила зеркальной симметрии обычно указывает на различное геометрическое расположение ядер в основном и возбужденном состояниях.

Кроме геометрических перегруппировок отклонение от правила зеркальной симметрии могут вызвать также реакции в возбужденных состояниях. Так, например, для фенола и тирозина наблюдается по две полосы испускания, причем длинноволновое испускание более заметно при высоких концентрациях акцепторов протона. В спектре испускания ([рис. 2.26](#)) видна колебательная структура, которая отсутствует в спектре поглощения. Такое отклонение от правила зеркальной симметрии обычно указывает на различное геометрическое расположение ядер в основном и возбужденном состояниях из-за относительно большого времени жизни состояния  $S_1$ . Молекулы пирена в возбужденном состоянии объединяются в комплексы, называемые эксимерами (сокращение от *excited dimers* – возбужденные димеры). Испускание эксимеров смещено в длинноволновую область по сравнению с испусканием мономеров пирена, в нем отсутствует колебательная структура ([рис. 2.26](#)).

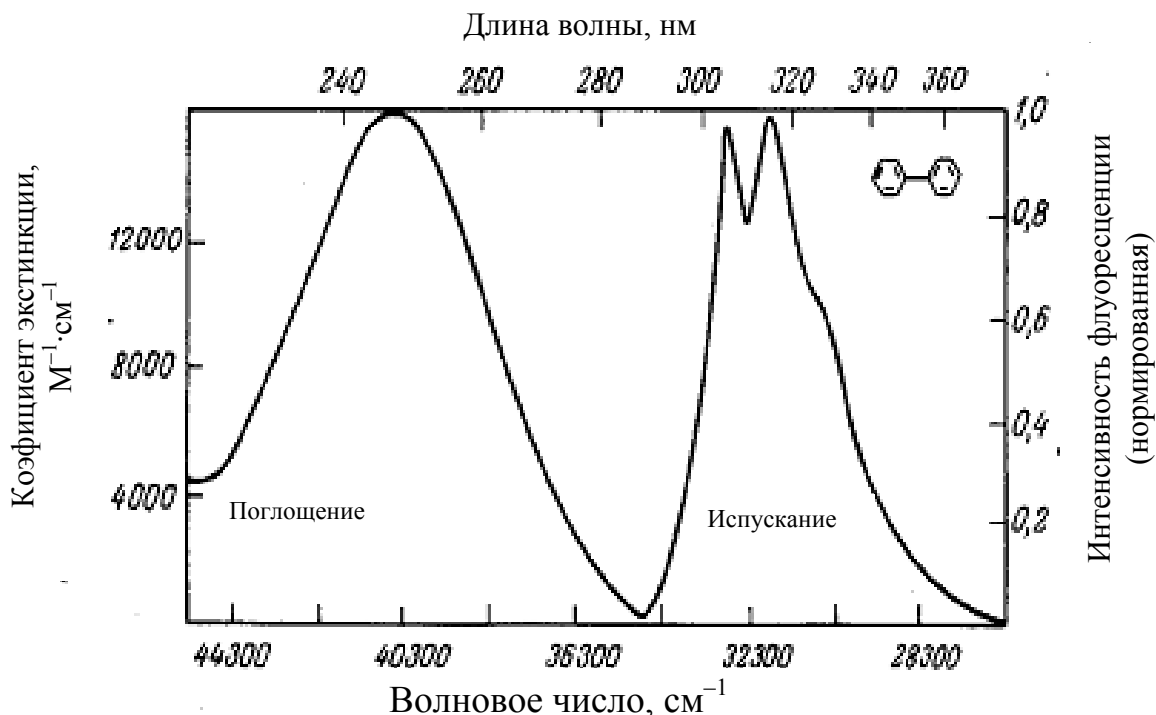


Рис. 2.25. Исключение из правила зеркальной симметрии: спектры флуоресценции дифенила

Такие полиядерные ароматические углеводороды, как пирен, перилен и антрацен, образуют с аминами комплексы с переносом заряда. Комплексы, образующиеся в возбужденном состоянии, называют эксиплексами.

### 2.8.5. Времена затухания и квантовые выходы флуоресценции.

На модифицированной диаграмме Яблонского (рис. 2.27) продемонстрированы процессы, которые отвечают за возвращение в основное состояние: константа скорости излучательной дезактивации флуорофора –  $\Gamma$  и константа скорости безызлучательной дезактивации в состояние  $S_0$  –  $k$ . Обе константы скорости  $\Gamma$  и  $k$  соответствуют процессам уменьшения заселенности возбужденного состояния.

Отношение числа испущенных фотонов к числу поглощенных называется *квантовый выход флуоресценции*. Доля молекул флуорофора, которые дезактивируются с испусканием, а, следовательно, и квантовый выход определяются выражением

$$Q = \Gamma / (\Gamma + k).$$

Квантовый выход близок к единице в том случае, если константа скорости безызлучательной дезактивации много меньше константы скорости испускания, т. е.  $k \ll \Gamma$ . Энергетический выход флуоресценции всегда меньше единицы из-за стоксовых потерь.

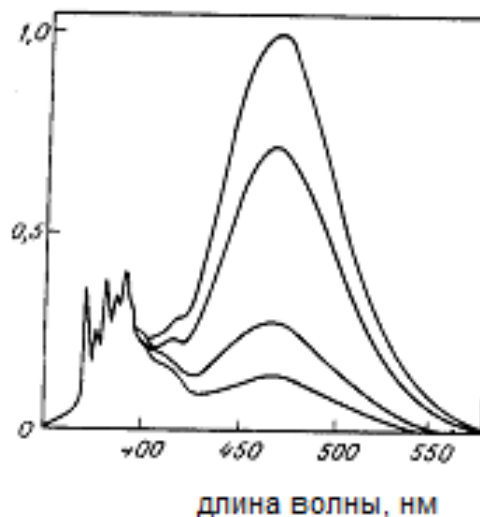


Рис. 2.26. Спектры испускания пирена и его эксимера

Время жизни возбужденного состояния определяется как среднее время, в течение которого молекула находилась в возбужденном состоянии до того, как вернуться в основное состояние. Обычно время затухания флуоресценции составляет 10 нс. Для флуорофора, описываемого диаграммой Яблонского ([рис. 2.27](#)), время затухания равно:

$$\tau = 1/(\Gamma + k).$$

Так как испускание флуоресценции – это случайный процесс и не все молекулы испускают фотоны при  $t = \tau$ , то время жизни – это средняя продолжительность пребывания в возбужденном состоянии.

Время жизни флуорофора в отсутствие безызлучательных процессов, называемое собственным временем жизни  $\tau_0$ , равно:

$$\tau_0 = 1/\Gamma.$$

Тогда соотношение между квантовым выходом и временем жизни имеет следующий вид:

$$Q = \tau / \tau_0.$$

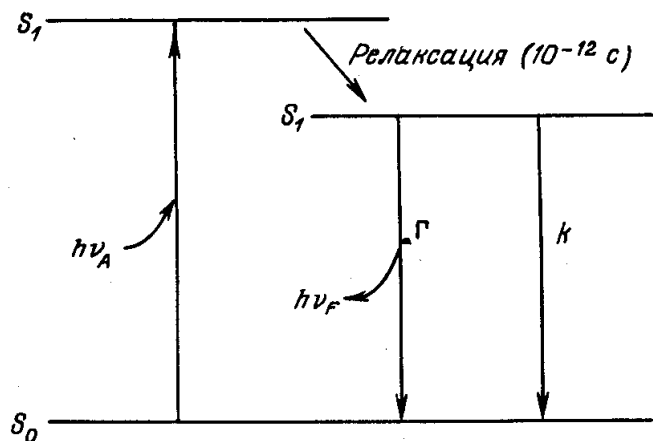


Рис. 2.27. Модифицированная диаграмма Яблонского

Квантовый выход и время жизни могут изменяться под действием любых факторов, влияющих на константы скорости. Например, молекула может оказаться неспособной флуоресцировать из-за большой скорости внутренней конверсии либо малой скорости испускания.

Заселенность возбужденных состояний молекул после возбуждения уменьшается по экспоненциальному закону, поэтому для флуорофора одного типа интенсивность будет подчиняться одноэкспоненциальному закону затухания:

$$I(t) = I_0 \cdot \exp(-t / \tau).$$

Спад люминесценции биологических молекул, как правило, может быть описан только суммой нескольких экспонент:

$$I(t) = \sum_{i=1}^N p_i \cdot \exp(-t / \tau_i).$$

### 2.8.6. Анизотропия флуоресценции.

Флуорофоры преимущественно поглощают те фотоны, электрические векторы которых направлены параллельно моменту перехода флуорофора. Момент перехода имеет определенную ориентацию в молекуле флуорофора (рис. 2.28). В изотропных растворах молекулы флуорофоров ориентированы случайным образом. Фотоселекция наблюдается, когда при возбуждении поляризованным светом селективно возбуждаются те молекулы флуорофора, для которых дипольный момент перехода при поглощении параллелен электрическому вектору возбуждающего света. Селективное возбуждение частично ориентированного набора флуорофоров приводит к частично поляризованному испусканию флуоресценции. Анизотропия ( $r$ ) и поляризация ( $P$ ) флуоресценции могут быть определены по формулам:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}, \quad r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}},$$

где  $I_{\parallel}$  и  $I_{\perp}$  – интенсивности флуоресценции вертикально ( $\parallel$ ) и горизонтально ( $\perp$ ) поляризованного испускания в случае возбуждения образца вертикально поляризованным светом. Для каждого флуорофора моменты перехода для поглощения и испускания имеют фиксированную ориентацию, и угол между ними определяет максимальную измеряемую анизотропию  $r_0$ .

К факторам, уменьшающим измеряемую величину анизотропии, относятся вращательная диффузия, перенос энергии возбуждения между флуорофорами. Вращательная диффузия происходит за время жизни возбужденного состояния, смещает испускающий диполь флуорофора, относительное угловое смещение флуорофора находится в интервале между поглощением и испусканием. Анизотропия с учетом вращательной диффузии:

$$r = \frac{r_0}{1 + (\tau / \varphi)},$$

где  $r_0$  – анизотропия, которая должна была бы измеряться в отсутствие вращательной диффузии,  $\varphi$  – время корреляции для процесса диффузии:

$$\varphi = \frac{\eta V}{kT},$$

где  $\eta$  – вязкость раствора,  $k$  – константа Больцмана,  $T$  – абсолютная температура,  $V$  – объем вращающегося фрагмента.

Измерения поляризации флуоресценции широко используют для изучения гидродинамических свойств макромолекул. Рассмотрим белок с молекулярной массой 50 000. Поскольку удельный объем белков составляет 0,73 мл/г, можно легко подсчитать, что при 25 °С в водном растворе ожидаемое время корреляции составляет 13 нс для безводной сферы. Так как белки гидратированы, фактическое время корреляции, по-видимому, должно быть больше. Времена вращательной корреляции для большинства белков сравнимы с типичными временами затухания флуоресценции, поэтому результаты измерения анизотропии флуоресценции зависят от всех факторов, влияющих на скорость вращательной диффузии.

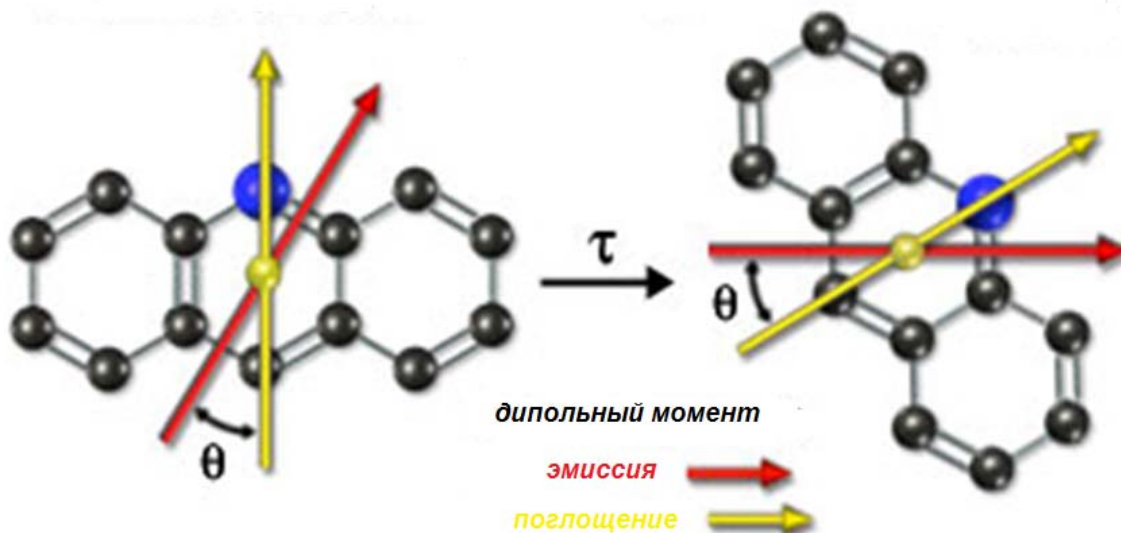


Рис. 2.28. Момент перехода в молекуле флуорофора

### 2.8.7. Временная шкала молекулярных процессов в растворе.

Параметры флуоресцентной спектроскопии являются чувствительными функциями всех процессов, протекающих за время жизни возбужденного состояния, причем в этих процессах могут участвовать молекулы, находящиеся в момент возбуждения на расстояниях до 100 Å от флуорофора, в отличие от абсорбционной спектроскопии. Может показаться, что время жизни – 10 нс – слишком короткий промежуток времени, фактически это большое время по сравнению с временем движения малых молекул в жидком растворе. Вращательная диффузия связанных с белками и мембранами флуорофоров также укладывается в этот временной диапазон.

Временной диапазон между поглощением света и последующим его испусканием достаточен для протекания нескольких процессов, каждый из которых приводит к ослаблению наблюдаемых спектральных характеристик флуоресценции:

- столкновения с тушителями;
- вращательная и поступательная диффузии;
- образование комплексов с растворителями;
- образование комплексов с растворенными веществами;
- переориентация окружения молекулы в возбужденном состоянии с измененным дипольным моментом.

Органические молекулы, как правило, поглощают свет в диапазоне длин волн 200–500 нм, что соответствует энергиям от 140 до 60 ккал/моль. Вслед за поглощением у флуорофора изменяется (обычно возрастает) дипольный момент. Если молекулы растворителя также имеют дипольные моменты, они переориентируются вокруг диполя возбужденного состояния, понижая тем самым его энергию за 10–12 пс (рис. 2.29).

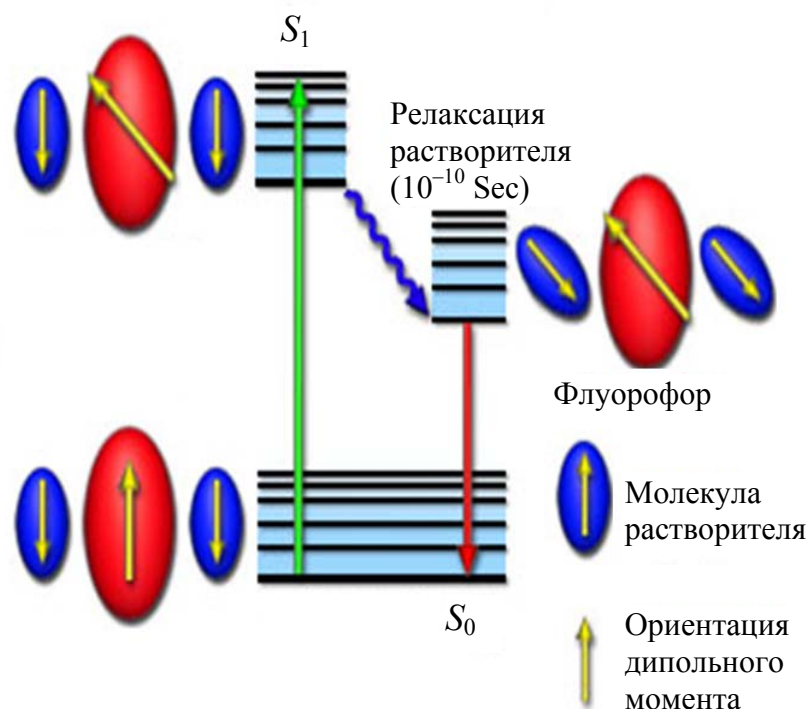


Рис. 2.29. Релаксация растворителя

Релаксация растворителя может приводить к значительным стоксовым сдвигам. В белках триптофановые остатки поглощают свет с длиной волны 280 нм, а испускают флуоресценцию при  $\sim 350$  нм. Таким образом, за несколько наносекунд, проходящих до процесса испускания, расходуется 20 ккал/моль.



## 2.9. Тушение флуоресценции. Уравнение Штерна – Фольмера

Тушением флуоресценции называют любые процессы, которые уменьшают интенсивность флуоресценции данного вещества. К тушению могут приводить множество процессов, в том числе реакции в возбужденном состоянии, перенос энергии, образование комплексов и тушение при столкновениях.

Выделяют статическое тушение, которое связано с образованием комплекса. Статическое тушение часто является осложняющим фактором в анализе динамического тушения. В дополнение к процессам, упомянутым выше, может встречаться *кажущееся тушение*, возникающее вследствие оптических свойств образца. Например, высокая оптическая плотность или мутность могут приводить к уменьшению интенсивности флуоресценции. Это *тривиальный тип тушения*, который несет мало информации о молекулярных процессах. Для тушения, и статического, и динамического, требуется контакт между молекулами флуорофора и тушителя. В случае динамического тушения тушитель должен диффундировать к флуорофору в течение времени нахождения в возбужденном состоянии (рис. 2.30, а). В результате контакта флуорофор возвращается в основное состояние без излучения фотона. В случае статического тушения между флуорофором и тушителем образуется комплекс, который не флуоресцирует (рис. 2.30, б). В любом случае, чтобы произошло тушение, флуорофор и тушитель должны контактировать.

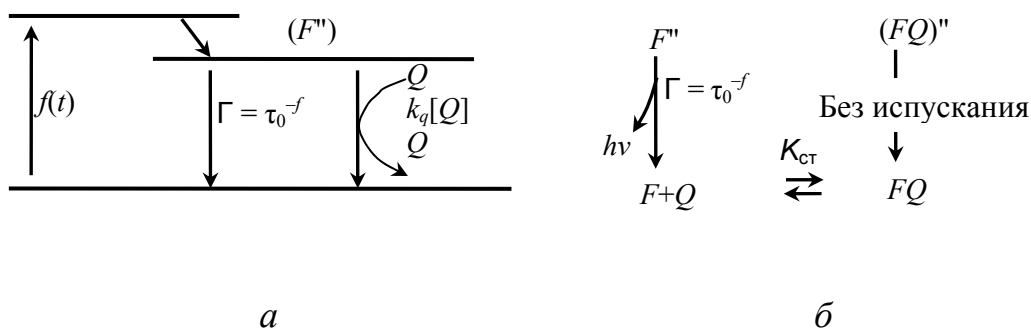


Рис. 2.30. Динамическое (а) и статическое (б) тушение флуоресценции:  $F_0$  и  $F$  – интенсивности флуоресценции в отсутствие и в присутствии тушителя соответственно;  $k_q$  – биомолекулярная константа скорости тушения;  $\tau_0$  – время затухания флуоресценции в отсутствие тушителя;  $[Q]$  – концентрация тушителя

Динамическое тушение флуоресценции описывается уравнением Штерна – Фольмера:

$$F_0 / F = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{\text{дин}} [Q], \quad (2.1)$$

где  $F_0$  и  $F$  – интенсивности флуоресценции в отсутствие и в присутствии тушителя соответственно;  $k_q$  – биомолекулярная константа скорости тушения;  $\tau_0$  – время затухания флуоресценции в отсутствие тушителя;  $[Q]$  – концентрация тушителя;  $K_{\text{дин}} = k_q \tau_0$  – штерн-фольмеровская константа тушения.

Для вывода уравнения Штерна – Фольмера рассмотрим интенсивность флуоресценции в отсутствие и в присутствии тушителя (рис. 2.30, а). Интенсивность флуоресценции, наблюдаемая для флуорофора, пропорциональна его концентрации в возбужденном состоянии  $F^*$ . При непрерывном облучении устанавливается стационарная концентрация возбужденных флуорофоров и, следовательно,  $d[F^*]/dt = 0$ . В отсутствие и в присутствии тушителя дифференциальные уравнения, описывающие  $F^*$ , представляются в виде

$$d[F^*]/dt = f(t) - \Gamma[F^*]_0 = 0, \quad (2.2)$$

$$d[F^*]/dt = f(t) - (\Gamma + k_q[Q])[F^*] = 0, \quad (2.3)$$

где  $f(t)$  – постоянная функция возбуждения флуоресценции, которая легко исключается из этих уравнений.  $\Gamma = \tau_0^{-1}$  представляет собой константу скорости дезактивации флуорофора в отсутствие тушителя. Из уравнений (2.2) и (2.3) получаем уравнение Штерна – Фольмера:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\Gamma + k_q[Q]}{\Gamma} = 1 + k_q \tau_0, \quad (2.4)$$

или перепишем полученное соотношение как отношение скорости затухания  $\Gamma$  флуоресценции к общей скорости затухания в присутствии тушителя ( $\Gamma + k_q[Q]$ ):

$$\frac{F}{F_0} = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_q[Q]} = \frac{1}{1 + K_{\text{дин}}[Q]}. \quad (2.5)$$

Полученное выражение также является уравнением Штерна – Фольмера. Так как динамическое тушение – конкурирующий процесс, который дезактивирует возбужденное состояние, время затухания в отсутствие ( $\tau_0$ ) и в присутствии ( $\tau$ ) тушителя дается выражениями:

$$\tau_0 = \Gamma^{-1}, \quad (2.6)$$

$$\tau = (\Gamma + k_q [Q])^{-1} \quad (2.7)$$

и, следовательно,

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 [Q]. \quad (2.8)$$

Последнее выражение иллюстрирует важную характеристику динамического тушения, которая состоит в одинаковом уменьшении интенсивности и времени затухания флуоресценции ([рис. 2.31](#)):

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau}. \quad (2.9)$$

Уменьшение времени затухания происходит из-за того, что тушение представляет собой дополнительный конкурирующий процесс, дезактивирующий возбужденное состояние без испускания флуоресценции, что ведет к уменьшению квантового выхода. Благодаря этим ценным свойствам тушение при столкновениях используют для контроля времени затухания с последующим определением природы наносекундной кинетики затухания анизотропии или временной зависимости релаксации растворителя.

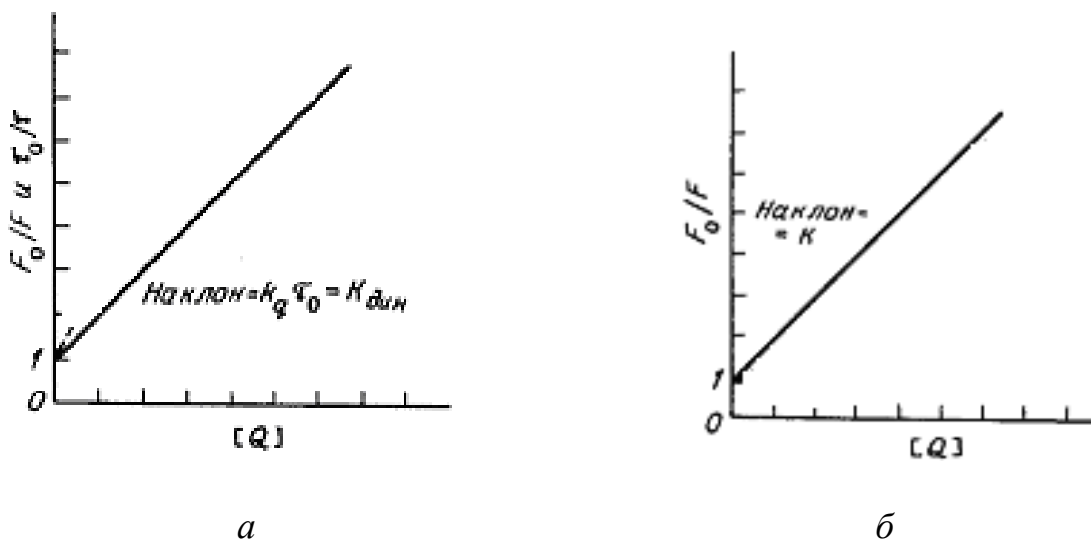


Рис. 2.31. Динамическое (а) и статическое (б) тушение флуоресценции

Данные по тушению обычно представляют в координатах  $F_0/F$  от  $[Q]$ , поскольку  $F_0/F$ , как ожидается, должно линейно зависеть от концентрации тушителя. График дает отсекаемый отрезок на оси  $y$ , равный единице, и наклон, равный  $K_{дин}$  ([рис. 2.31](#)). Полезно отметить, что  $K_{дин}^{-1}$  равна

концентрации тушителя, при которой  $F_0/F = 2$ , т. е. тушится 50 % интенсивности флуоресценции. Прямолинейная зависимость в координатах Штерна – Фольмера обычно указывает на существование в растворе одного типа флуорофоров, одинаково доступных для тушителя. Если присутствуют два типа флуорофоров и один из них недоступен для тушителя, то штерн-фольмеровский график отклоняется от линейности в сторону оси  $x$ . Такой результат часто встречается при тушении флуоресценции триптофана в белках полярными или заряженными тушителями. Эти молекулы с трудом проникают внутрь гидрофобных белков и тушат только остатки триптофана на поверхности белка.

Частота столкновений флуорофора с тушителем дается выражением

$$Z = k_0[Q], \quad (2.10)$$

где  $k_0$  – диффузионно-контролируемая бимолекулярная константа скорости, которая может быть вычислена по уравнению Смолуховского:

$$k_0 = 4\pi RDN / 1000 = \frac{4\pi N}{1000} (R_f + R_q)(D_f + D_q), \quad (2.11)$$

где  $R$  – радиус столкновения;  $D$  – сумма коэффициентов диффузии флуорофора ( $D_f$ ) и тушителя ( $D_q$ );  $N$  – число Авогадро. Радиус столкновения обычно принимается равным сумме молекулярных радиусов флуорофора ( $R_f$ ) и тушителя ( $R_q$ ). Уравнение описывает диффузионный поток молекул с коэффициентом диффузии  $D$  через поверхность сферы радиуса  $R$ . Фактор 1000 необходим для соблюдения размерности в тех случаях, когда концентрация выражена в молях на литр: умножением на  $(N/1000)$  молярность пересчитывают в молекулы/см<sup>3</sup>.

Частота столкновений связана с бимолекулярной константой скорости тушения через эффективность тушения  $\gamma$ :

$$k_q = \gamma k_0. \quad (2.12)$$

Например, если  $\gamma = 0,5$ , то только 50 % диффузионных столкновений приводят к тушению и  $k_q$  должно быть равно  $k_0/2$ . Так как  $k_0$  определяется с достаточной точностью, наблюдаемое значение  $k_q$  может быть использовано для оценки эффективности тушения. У тушителей, подобных кислороду и  $I_2$ , эффективность обычно близка к единице, а у более легких галогенов – меньше.

Эффективность тушения может быть рассчитана на основе наблюдаемого значения  $k$ , если известны коэффициенты диффузии и молекулярные радиусы. Радиусы можно найти из молекулярных моделей или молекулярных масс и плотностей исследуемых веществ. Коэффициенты диффузии можно вычислить по уравнению Стокса – Эйнштейна:

$$D = kT / 6\pi\eta R, \quad (2.13)$$

где  $k$  – константа Больцмана;  $\eta$  – вязкость растворителя. Это уравнение описывает диффузию молекул, по размерам превышающих молекулы растворителя, поэтому оно неприменимо, например, для кислорода в этаноле. Если коэффициенты диффузии известны, то бимолекулярную константу скорости тушения для  $\gamma = 1$  можно предсказать, используя уравнение Смолуховского (2.11).

### 2.9.1. Статическое тушение.

Тушение может также происходить в результате образования нефлуоресцирующего комплекса в основном состоянии между флуорофором и тушителем. Как только произошло поглощение света, комплекс немедленно возвращается в основное состояние без испускания фотона (рис. 2.30, б).

Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации тушителя легко вывести, используя константу ассоциации комплекса, записываемую следующим образом:

$$K_{\text{нб}} = \frac{[F - Q]}{[F][Q]}, \quad (2.14)$$

где  $[F - Q]$  – концентрация комплекса;  $[F]$  – концентрация несвязанного флуорофора. Если закомплексованная форма не флуоресцирует, то доля оставшейся флуоресценции ( $F/F_0$ ) определяется той частью от общего количества флуорофоров, которая не закомплексована ( $f$ ), т. е.  $f = F/F_0$ . Общая концентрация флуорофора  $[F]$  равна:

$$[F_0] = [F] + [F - Q]. \quad (2.15)$$

Подстановка в (2.14) дает

$$K_{\text{нб}} = \frac{[F_0] - [F]}{[F][Q]} = \frac{[F_0]}{[F][Q]} - \frac{1}{[Q]}. \quad (2.16)$$

Концентрации флуорофора можно заменить на интенсивности флуоресценции и преобразовать выражение (2.16) к виду

$$F_0/F = 1 + K_{\text{ст}}[Q]. \quad (2.17)$$

Зависимость  $F_0/F$  от  $[Q]$  идентична зависимости, получаемой для динамического тушения, за исключением того что константа скорости тушения здесь заменяется константой ассоциации.

Для идентификации статического и динамического тушения можно использовать времена затухания или зависимость тушения от температуры или вязкости. Измерение времени затухания флуоресценции – наиболее четкий метод для различения статического и динамического тушений. Из-за статического тушения часть флуорофоров не наблюдается. Связанные в комплекс флуорофоры не флуоресцируют, и наблюдается флуоресценция только несвязанных флуорофоров. Не связанная в комплекс часть флуорофоров не возмущена, и, следовательно, для нее время затухания равно  $\tau$ . Таким образом, для статического тушения  $\tau_0 / \tau = 1$  (рис. 2.31), в то время как для динамического тушения  $F_0/F = \tau_0/\tau$ .

Отличие статического тушения от динамического часто может быть установлено не только измерением времен затухания, но и путем рассмотрения других факторов. Динамическое тушение зависит от диффузии. Поскольку повышение температуры приводит к увеличению коэффициентов диффузии, можно ожидать, что бимолекулярная константа скорости тушения возрастет с увеличением температуры (рис. 2.32). Точнее, следует ожидать, что  $k_q$  будет пропорциональна  $T/\eta$ , так как коэффициенты диффузии пропорциональны этому отношению (уравнение (2.13)). При росте температуры скорее всего уменьшается стабильность комплексов и тем самым значения констант статического тушения.

Еще одним дополнительным методом для отличия статического тушения от динамического может служить тщательный анализ спектра поглощения флуорофора. Динамическое тушение влияет только на возбужденные состояния флуорофоров, и можно полагать, что оно не изменит спектры поглощения. В противоположность этому образование комплекса в основном состоянии часто приводит к возмущению спектра поглощения флуорофора.

### 2.9.2. Смешанное динамическое и статическое тушение.

Во многих случаях флуорофор может быть потушен за счет как столкновений, так и образования комплекса с тушителем, в этом случае говорят о смешанном динамическом и статическом тушении (рис. 2.33).

Характерная особенность графика Штерна – Фольмера в таких случаях – отклонение вверх и вогнутость по отношению к оси  $y$  (рис. 2.34, а).

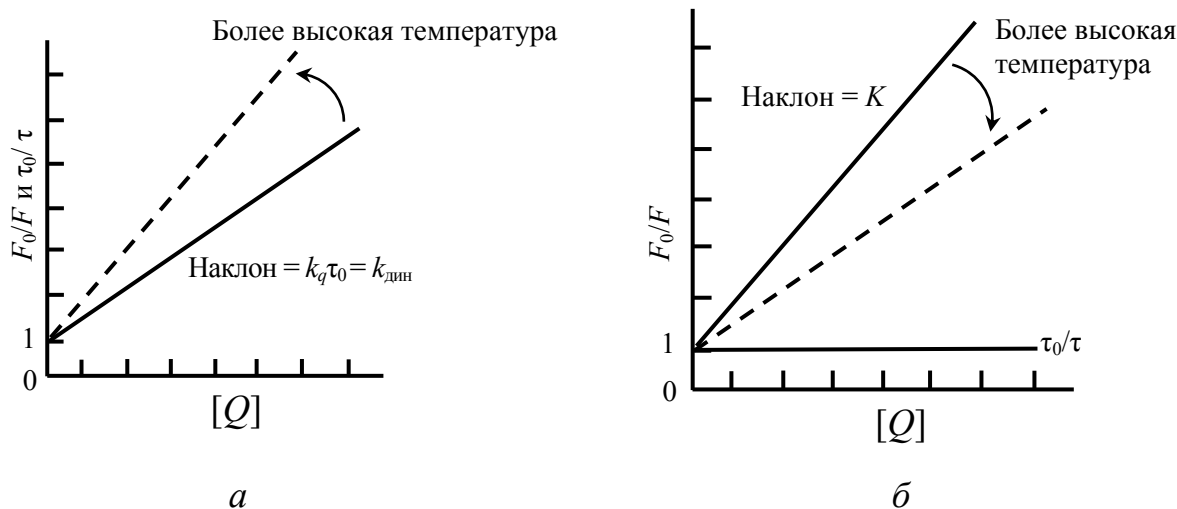


Рис. 2.32. Идентификации динамического (а) и статического (б) тушения флуоресценции

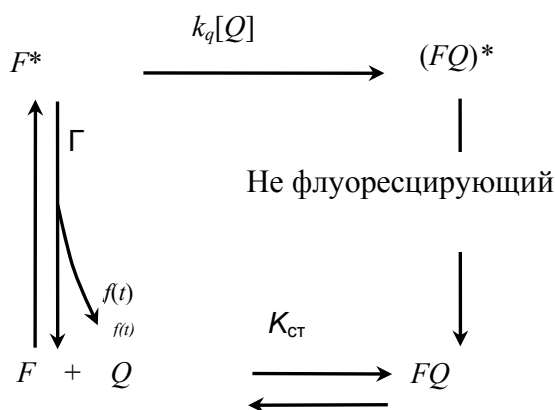


Рис. 2.33. Смешанное динамическое и статическое тушение

Остаточная флуоресценция ( $F/F_0$ ) определяется произведением доли, не связанной в комплекс ( $f$ ), и доли, не потушенной диффузионными столкновениями:

$$F_0/F = (1 + K_{\text{дин}}[Q])(1 + K_{\text{ст}}[Q]). \quad (2.18)$$

Эта модифицированная форма уравнения Штерна – Фольмера является уравнением второго порядка относительно  $[Q]$ , что объясняет изгиб графика кверху, наблюдаемый, когда флуорофор одновременно тушится как по статическому, так и по динамическому механизму (рис. 2.34).

Доля динамического тушения в наблюдаемом уменьшении флуоресценции может быть определена по изменению времен затухания, т. е. по зависимости  $\tau_0/\tau = 1 + K_{\text{дин}}[Q]$ . Если таких данных нет, то уравнение (2.18) может быть преобразовано для графического определения  $K_{\text{ст}}$  и  $K_{\text{дин}}$ . После перемножения членов в скобках получится:



$$F_0/F = 1 + (K_{\text{дин}} + K_{\text{ст}})[Q] + K_{\text{дин}}K_{\text{ст}}[Q]^2 = 1 + K_{\text{каж}}[Q], \quad (2.19)$$

где

$$K_{\text{каж}} = (K_{\text{дин}} + K_{\text{ст}}) + K_{\text{дин}}K_{\text{ст}}[Q] = \frac{F_0/F - 1}{[Q]}. \quad (2.20)$$

Кажущаяся константа скорости тушения  $K_{\text{каж}}$  вычисляется для каждой концентрации тушителя. График зависимости  $K_{\text{каж}}$  от  $[Q]$  представляет собой прямую линию с отсекаемым на оси  $y$  отрезком, равным  $K_{\text{ст}} + K_{\text{дин}}$ , и наклоном, равным  $K_{\text{ст}}K_{\text{дин}}$  (рис. 2.34, б).

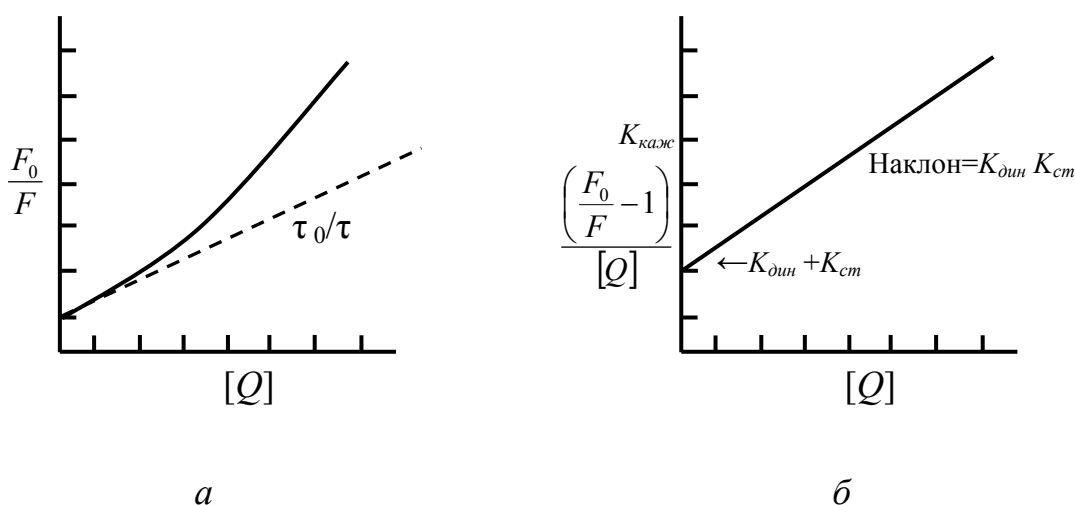


Рис. 2.34. Смешанное динамическое и статическое тушение:  
а – отклонение от графика Штерна – Фольмера; б – графическое определения  $K_{\text{ст}}$  и  $K_{\text{дин}}$

### 2.9.3. Тушители флуоресценции.

Многие вещества действуют как тушители флуоресценции. Один из наиболее известных динамических тушителей – молекулярный кислород, который тушит флуоресценцию почти всех известных флуорофоров. Ароматические и алифатические амины – эффективные тушители для флуоресценции большинства незамещенных ароматических углеводов. Например, флуоресценция антрацена эффективно тушится диэтиланилином. В этом случае тушение происходит за счет образования комплекса с переносом заряда. Флуорофор в возбужденном состоянии акцептирует электроны амина. В неполярных растворителях часто наблюдается флуоресценция комплекса с переносом заряда (*эксиплекс*), и этот процесс можно рассматривать как реакцию в возбужденном состоянии, а не как тушение. В полярных растворителях излучение эксиплекса обычно потушено, так что взаимодействие флуорофор – амин проявляется как истинное тушение. Другие диффузионные тушители: ксенон, пероксид

водорода, акриламид,  $I$ , оксид диазота, нитрометан, нитроксиды. В качестве диффузионных тушителей можно назвать многие галогенсодержащие вещества: хлороформ, трихлорэтанол, бромбензол, хлорид метилртути и различные соединения, содержащие более одного атома хлора. Тушение тяжелыми галогенами, такими как бромид и иодид, может быть результатом интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние, ускоряющейся за счет спин-орбитального взаимодействия возбужденного в синглетном состоянии флуорофора и галогена. Так как испускание из триплетного состояния медленное, то оно сильно тушится другими процессами. Однако для хлорсодержащих веществ механизм тушения, вероятно, другой. Индол, карбазол и их производные уникально чувствительны к тушению хлорированными углеводородами и акцепторами электронов, такими как протоны, гистидин, цистеин, фумарат,  $Cu^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  и  $Mn^{2+}$ . Тушение этими веществами, вероятно, включает перенос электрона от флуорофора на тушитель. Кроме этого индол, триптофан и их производные тушатся сукцинимидом, дихлорацетамидом, гидрохлоридами пиридина и имидазола, метионином,  $Eu^{3+}$ ,  $Ag^+$  и  $Cs^+$ . Следовательно, множество тушителей пригодно для изучения флуоресценции белков, в особенности при рассмотрении поверхностной доступности триптофановых остатков и проницаемости белков для тушителей.

Тушителями могут быть также пурины, пиримидины, *N*-метилникотинамиды и *N*-алкилпиридиниевые и пиколиниевые соли. Например, флуоресценция флавинадениндинуклеотида (*FAD*) и восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (*NADH*) тушится адениновой частью молекулы. Тушение флуоресценции флавина происходит вследствие как статических, так и динамических процессов, в то время как тушение дигидроникотинамида является в основном динамическим. Эти ароматические соединения проявляют склонность к образованию комплексов с переносом заряда, что и вызывает тушение флуоресценции. В зависимости от точной структуры изучаемых соединений внутримолекулярный комплекс в основном состоянии может быть достаточно устойчивым. Вследствие этого в *FAD* и *NADH* часто наблюдается и динамическое, и статическое тушение.

Многие вещества могут действовать как тушители, поэтому легко подобрать комбинацию флуорофор – тушитель для решения поставленной задачи, при этом необходимо учитывать, что не все флуорофоры тушатся любыми перечисленными выше веществами. Этот факт иногда можно использовать для селективного тушения определенного флуорофора. Эффект тушения зависит от его механизма, обусловленного структурой индивидуальных молекул. Детальный анализ механизма тушения сложен.

Измерением тушения можно выявить доступность флуорофоров для тушителей. Если данный растворитель очень вязок, то диффузия замедляется и тушение ослабевает. Следовательно, изучив тушение, можно определить скорости диффузии тушителей. Например, флуорофор связан либо с белком,

либо с мембраной. Если белок или мембрана непроницаемы для тушителя и флуорофор локализован внутри макромолекулы, то не может быть ни динамического, ни статического тушения. В этом случае тушение можно использовать для выяснения локализации флуорофоров в белках и мембранах и их проницаемости для тушителей.

Другой важный аспект динамического тушения – увеличение объемов и расстояний в растворе, влияющих на экспериментальные данные, которыми являются интенсивность или время затухания флуоресценции. Среднеквадратичное смещение  $(\Delta x^2)^{1/2}$ , на которое тушитель может продиффундировать за время жизни возбужденного состояния  $\tau$ , составляет  $(\Delta x^2) = 2D\tau$ , где  $D$  – коэффициент диффузии.

## 2.10. Биологически важные флуоресцирующие молекулы

Флуоресценция молекул может стать важным источником информации о процессах, протекающих в биологических системах различной сложности. Экспериментальные методы детектирования излучения в оптическом диапазоне к настоящему времени развились настолько, что позволяют регистрировать испускание нескольких фотонов. Такая чувствительность делает флуоресцентную спектроскопию незаменимым инструментом для изучения живых систем на молекулярном уровне. В некоторых случаях биологический объект содержит собственные, *природные* или *естественные*, флуорофоры и может сам «рассказать» о себе светом. В других случаях флуоресцентные свойства изучаемых систем не позволяют получить из эксперимента желаемую информацию. Тогда объект снабжают посторонними для него, но, по возможности, безвредными флуоресцирующими веществами, называемыми *искусственными* флуорофорами. Примеры биологически важных флуоресцирующих молекул приведены на [рис. 2.35](#).

При исследовании структуры и динамики биологических объектов с помощью природных и искусственных флуорофоров для получения необходимой информации могут быть использованы следующие параметры:

- интенсивность люминесценции;
- спектр флуоресценции (положение максимума, полуширина);
- время жизни флуоресцентного состояния;
- характеристики поляризации (или анизотропии) флуоресценции;
- эффективность резонансного переноса энергии.

Планируя изучение фотобиологических процессов методами флуоресцентной спектроскопии, особое внимание следует уделять выбору элементов экспериментальной установки. Но не меньшее внимание должно быть уделено выбору флуорофора, люминесценция которого будет нести необходимую вам информацию об объекте. Характеристики этого репортерного флуорофора должны удовлетворять определенным требованиям:

1. Подходящие спектрально-люминесцентные характеристики. Желательно, чтобы спектры поглощения и испускания флуорофора мало перекрывались со спектрами компонентов биологического объекта, тогда при регистрации удастся избежать помех со стороны фоновой люминесценции.
2. Высокий коэффициент молярной экстинкции. Данное свойство позволяет использовать низкие интенсивности для возбуждения люминесценции флуорофора.
3. Высокий квантовый выход флуоресценции. Это свойство определяет интенсивную фотолюминесценцию флуорофора.
4. Фотостабильность. Многие люминесцирующие молекулы удобны для исследований, но быстро разрушаются под воздействием света даже видимого диапазона.
5. Компактность молекулы. Это важно при выборе искусственного флуорофора. Маленькие молекулы легче проникают в биологический объект и присоединяются к молекуле-мишени без существенного влияния на ее характеристики.

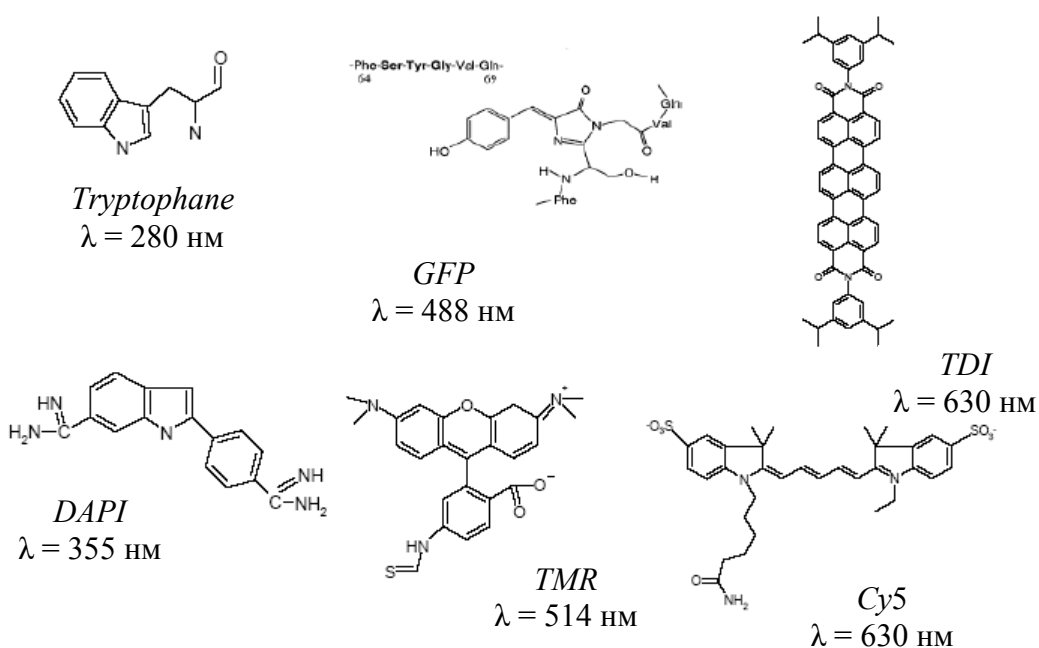


Рис. 2.35. Биологически важные флуоресцирующие молекулы и длины волн флуоресценции

Краткую характеристику самых важных представителей природных и искусственных флуорофоров мы приведем ниже.

## 2.11. Природные флуорофоры

Многие молекулы, входящие в состав биологических объектов, способны испускать свет при фотовозбуждении. Большинство используемых

в настоящее время природных флуорофоров можно отнести к одной из трех групп: аминокислоты, коферменты и пигменты. Флуоресцентные белки, которые могут использоваться как в качестве природных, так и искусственных флуорофоров, мы выделили в отдельный класс соединений.

### 2.11.1. Аминокислоты.

Из 20 аминокислот, входящих в состав белков, только три способны к фотолюминесценции в оптическом диапазоне – это триптофан, тирозин и фенилаланин. При этом около 90 % всей флуоресценции белков обычно обусловлено триптофановыми остатками. Электронные переходы в триптофане представлены на [рис. 2.36](#).

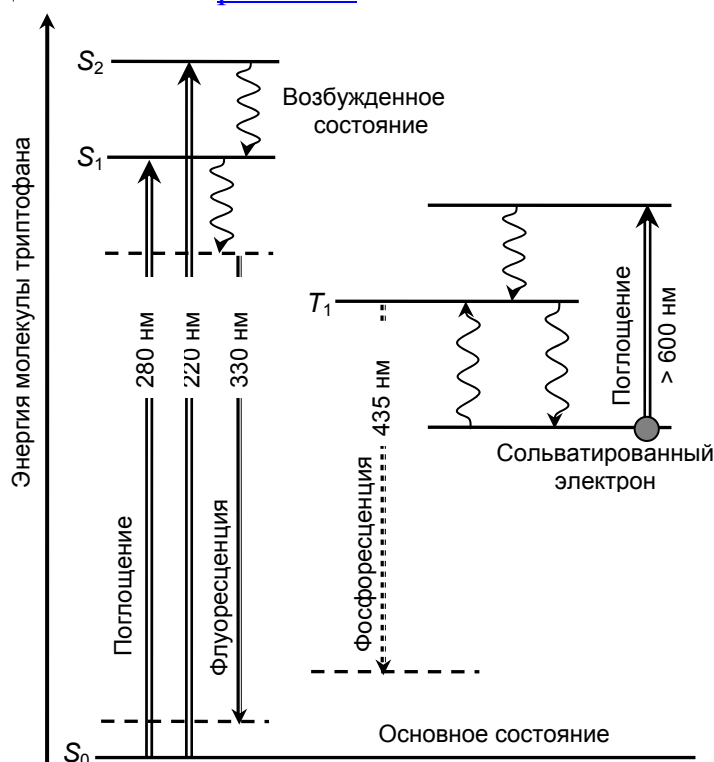


Рис. 2.36. Электронные переходы в триптофане

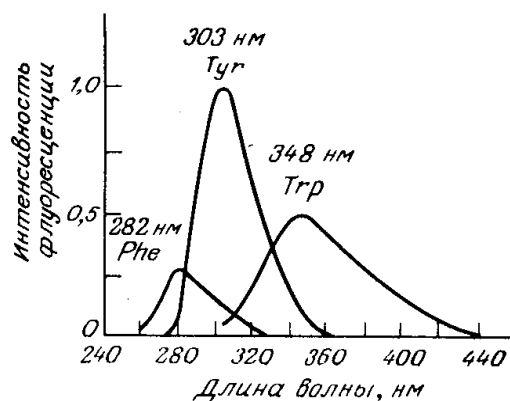


Рис. 2.37. Флуоресцентные спектры испускания ароматических аминокислот

Этот природный флуорофор очень чувствителен к полярности окружающей среды, что активно используется в исследованиях конформационной динамики белков. Максимум флуоресценции триптофанового остатка, спрятанного внутри белковой глобулы, сдвинут на 10–20 нм в коротковолновую область по сравнению с триптофаном на поверхности белка. Тирозиновые остатки, интенсивно флуоресцирующие в растворах, в составе белка излучают слабо. Возможными причинами тушения люминесценции тирозина могут быть взаимодействие с другими аминокислотными остатками белка и перенос энергии на триптофановые флуорофоры.

Флуоресценция фенилаланина наблюдается в белках, не содержащих триптофановых и тирозиновых остатков, что является довольно редким случаем. Спектры поглощения и флуоресценции триптофана, тирозина и фенилаланина представлены на [рис. 2.37](#). Спектрально-люминесцентные характеристики флуоресцентных аминокислот описаны в [табл. 2.3](#).

Таблица 2.3

Спектрально-люминесцентные характеристики  
некоторых природных флуорофоров

Флуорофор	Поглощение		Флуоресценция		
	$\lambda_{\max}^{abs}$ , нм	$\epsilon_{\max}$ , $10^{-3}$ $M^{-1} \cdot cm^{-1}$	$\lambda_{\max}^{fl}$ , нм	$\phi_{fl}$	$\tau_{fl}$ , нс
Триптофан'	295	5,6	353	0,13	3,1
Тирозин'	275	1,4	304	0,14	3,6
Фенилаланин'	260	0,2	282	0,02	6,8
У-основание ( $tRNA^{Phe}$ )	320	1,3	460	0,07	6,3
Аденин'	260	13,4	321	$2,6 \cdot 10^{-4}$	<0,02
Гуанин'	275	8,1	329	$3,0 \cdot 10^{-4}$	<0,02
Цитозин'	267	6,1	313	$0,8 \cdot 10^{-4}$	<0,02
Урацил'	260	9,5	308	$0,4 \cdot 10^{-4}$	<0,02
NAD H'	340	6,2	470	0,019	0,4
ФМН'	445	12,5	530	4,7	0,26
Хлорофилл а''	418, 660	11,2	671	0,32	4,6

*Примечание.*  $\lambda_{\max}^{abs}$  – длина волны максимума спектра поглощения,  $\epsilon_{\max}$  – коэффициент молярной экстинкции в максимуме спектра поглощения,  $\lambda_{\max}^{fl}$  – длина волны максимума спектра флуоресценции,  $\phi_{fl}$  – квантовый выход флуоресценции,  $\tau_{fl}$  – время жизни флуоресцентного состояния: ' в воде; '' в метаноле.

Отсутствие тирозинового испускания у большинства белков зависит от трехмерной структуры. Денатурация белков приводит к увеличению



испускания тирозинов, но их вклад обычно меньше, чем найденный для эквимоллярных смесей. Потеря тирозиновой флуоресценции белками определяется рядом факторов. Флуоресценция тирозина может быть потушена близко расположенными карбоксильными группами или незаряженными аминогруппами. Такое тушение связано с переносом протона на эти акцепторы протонов в течение времени жизни возбужденного состояния, что было доказано при изучении флуоресценции сополимеров тирозин-глутамат и тирозин-лизин. Кроме того, флуоресценция тирозина тушится также заряженными аминогруппами и нейтральными карбоксильными группами.

Механизм тушения может включать перенос протона от фенола либо в основном, либо в возбужденном состоянии. Образование пептидной связи карбоксильной группой или аминогруппой тирозина еще больше понижает его квантовый выход. В белках гидроксильная группа может образовывать водородную связь с пептидной связью, а связанные водородной связью фенолы не флуоресцируют. Следовательно, флуоресценция тирозина может отсутствовать или быть минимальной в белках по разным причинам. Для любого индивидуального белка точный механизм тушения тирозиновой флуоресценции не известен.

Хотя флуоресценция тирозина обычно слаба и нечувствительна к растворителям, часто бывает необходимо полностью исключать такой дополнительный источник гетерогенности во флуоресценции белков. Обычно это достигается путем возбуждения при 295 нм, где поглощение триптофана (но не тирозина) минимально.

### 2.11.2. Коферменты.

Напомним, что коферментами называют низкомолекулярные соединения, необходимые некоторым ферментам для проявления их каталитической активности. Среди коферментов довольно часто встречаются флуоресцентные соединения. Коферментами являются многие витамины.

Сильной флуоресценцией обладает молекула *NADH* (никотинамид-адениндинуклеотид восстановленный). Флуоресцирующей группой этого кофермента является восстановленное никотинамидное кольцо (рис. 2.38, а). В свободном состоянии (в растворах) флуоресценция никотинамидной части *NADH* частично потушена вследствие взаимодействия со вторым нуклеотидом – аденином. Связывание *NADH* с белками может воспрепятствовать контакту между нуклеотидами, и тогда квантовый выход флуоресценции этого кофермента может увеличиться до четырех раз. Окисленная форма этого соединения – *NAD<sup>+</sup>* не флуоресцирует.

Следующую группу флуоресцирующих коферментов составляют флавиносодержащие соединения – рибофлавин, *FMN* (флавиномононуклеотид) и *FAD* (флавинадениндинуклеотид). В молекуле *FAD* так же, как и в случае *NADH*, присутствует тушение люминесценции аденином. Молекула *FMN* в



отличие от *NADH* флуоресцирует только в окисленной форме (рис. 2.38, б). При связывании с белком флавиновые соединения, как правило, становятся нефлуоресцентными. Флуоресценция живых тканей в видимой области спектра, в частности, вызвана наличием окисленной формы флавопротеинов и восстановленной формы пиридиннуклеотидов (*NADH* и *NADPH*). *NADH* и флавопротеины участвуют в гликолизе; цикле Кребса; окислении жирных кислот; клеточном дыхании (любые сдвиги в клеточном дыхании отражаются на интенсивности флуоресценции). Усиление клеточного дыхания сопровождается изменением соотношения окисленных и восстановленных форм в сторону преобладания окисленных: нарастает желто-зеленая флуоресценция окисленных фотопротеинов (530 нм); затухает синяя флуоресценция восстановленных *NADH* (455 нм)).

При исследовании клеток животных среди других, флуоресцирующих в синей и желто-зеленой областях спектра, соединений можно встретить различные витамины, в том числе пиридоксали, фолиевую кислоту и ее производные и другие. Яркой люминесценцией с максимумом при 480 нм обладает витамин А.

### 2.11.3. Нуклеиновые кислоты.

Нуклеотиды и нуклеиновые кислоты обычно не флуоресцируют. Тем не менее существуют некоторые исключения. Фенилаланин-специфичная транспортная РНК (*tRNA<sup>Phe</sup>*) из дрожжей содержит интенсивно флуоресцирующее основание, известное как *Y*-основание. По данным, приведенным в табл. 2.3, можно сравнить характеристики люминесценции этого основания и других нуклеотидов.

Нуклеиновые кислоты имеют очень слабую флуоресценцию, которая не используется в исследованиях из-за слабых интенсивностей. Существуют красители, которые спонтанно связываются с ДНК, например акридины и др. Поэтому окрашивание клеток красителями, которые связываются с ДНК, широко используется для визуализации и идентификации хромосом.

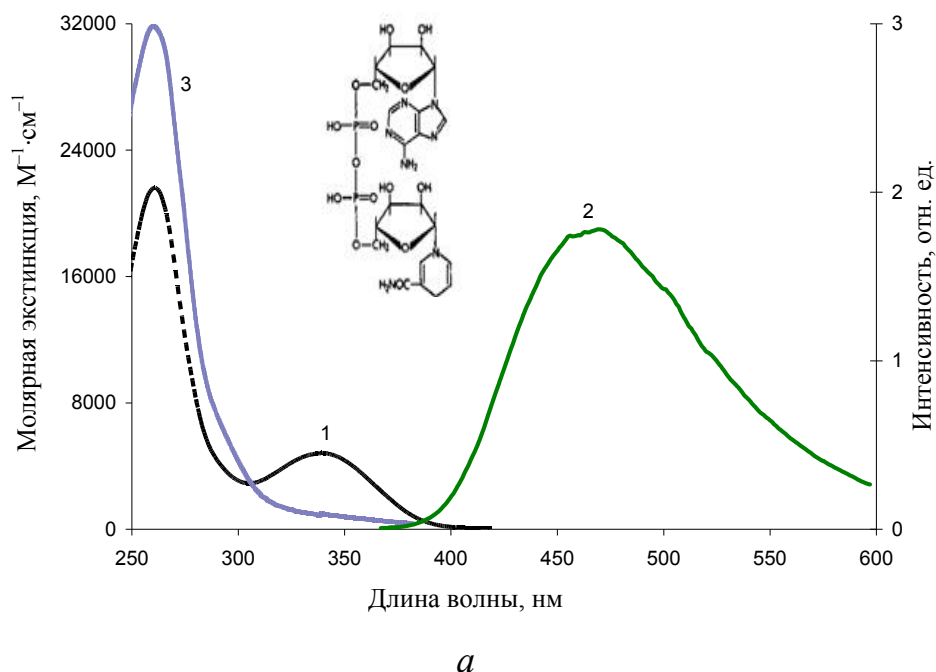
### 2.11.4. Пигменты.

Люминесценция животных и растительных клеток в красной области спектра чаще всего связана с присутствием в них пигментов порфиринов. Основу молекулы порфирина составляет тетрапиррольное кольцо. Порфириновая структура, обладающая яркой и характерной люминесценцией, входит в состав таких известных белков, как гемоглобин и миоглобин, а также в состав ферментов пероксидазы и каталазы и многочисленной группы цитохромов.

В гемопroteинах люминесценция порфиринов «погашена» присутствием атома железа. Однако в клетках с высокой скоростью синтеза этих соединений могут присутствовать значительные количества порфиринов, являющихся промежуточным продуктом в синтезе гема. С

другой стороны, патологические нарушения в обмене гемосодержащих соединений, например в результате некоторых отравлений, также могут приводить к появлению характерной люминесценции порфиринов в клетках и служить, таким образом, важным диагностическим тестом.

В клетках растений и водорослей содержится еще одна обширная группа порфиринов – хлорофиллы и бактериохлорофиллы, а также пигменты с разомкнутой тетрапиррольной цепью – фикобилины. Поскольку представители разных групп организмов имеют различающийся набор этих пигментов, то суммарный спектр флуоресценции таких клеток должен иметь видоспецифичную форму. Наблюдение за относительной интенсивностью полос люминесценции, характерных различным пигментам, в процессе старения популяции позволяет проводить исследование физиологии растительных клеток.



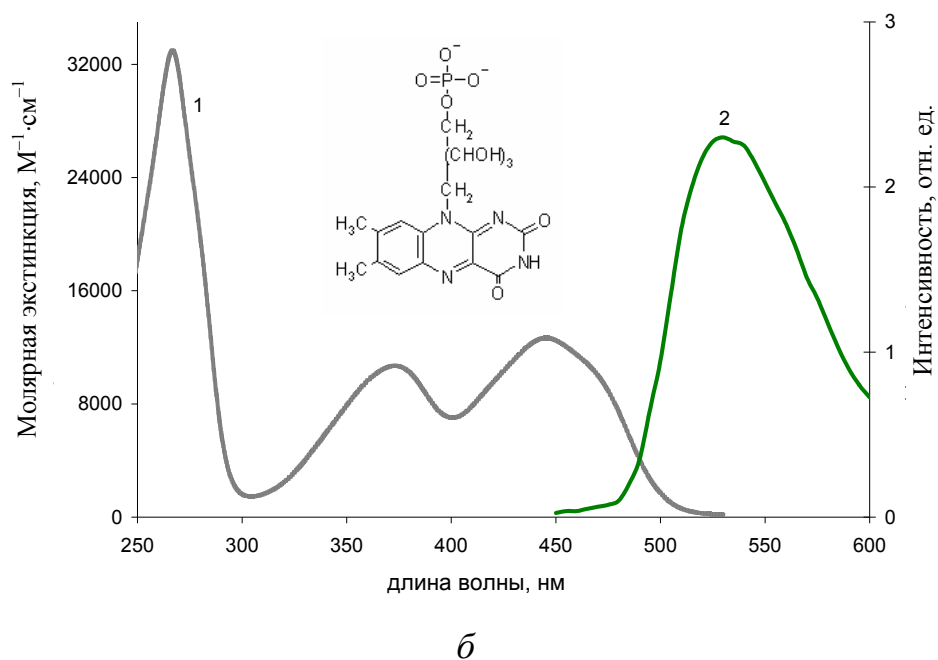


Рис. 2.38. Структурные формулы и спектры поглощения (1) и люминесценции (2) *NADH* (а) и ФМН (б).

На графике а представлен также спектр поглощения *NAD<sup>+</sup>* (3) (приведены собственные данные авторов)

Благодаря чрезвычайно яркой люминесценции хлорофиллы используются иногда в люминесцентной цитохимии в качестве специфического красителя – метки жиров. В этом случае они являются искусственными флуорофорами.

В заключение хочется отметить, что знание свойств основных классов природных флуоресцирующих молекул необходимо, даже если в своем исследовании вы собираетесь работать только с искусственными флуорофорами. Природные флуорофоры – источник собственного испускания (или автофлуоресценции) биологических объектов, и важно, чтобы это свечение не мешало регистрации сигнала от используемого зонда.

## 2.12. Искусственные флуорофоры

Во многих случаях объектом исследования являются процессы, связанные с нефлуоресцирующими молекулами. Так, например, молекулы ДНК или липиды не способны к люминесценции с необходимой интенсивностью. В таких случаях фотолюминесценции объекта добиваются введением в него специально подобранного флуорофора, который хотя и является посторонним по отношению к исследуемой системе, но имеет лучшие спектральные свойства. Искусственные флуорофоры называют также флуоресцентными зондами и флуоресцентными метками. В первом случае

флуорофор связывается с интересующей молекулой-мишенью нековалентными связями, во втором – ковалентными.

Число искусственных флуорофоров, применяемых для исследования биологических объектов, выросло многократно за последние десятилетия. Мы коснемся вкратце главных свойств только нескольких классов флуоресцентных соединений.

### 2.12.1. Флуорофоры для связывания с белками.

Анализ собственной флуоресценции белков часто затрудняется как обилием факторов, влияющих на флуоресценцию триптофана, так и наличием в белках нескольких остатков триптофана, различающихся микроокружением. Более того, спектры испускания зачастую сложны даже в случае белков, содержащих один триптофановый остаток. Поэтому для решения конкретных исследовательских задач широко применяются разнообразные флуорофоры, связывающиеся с белком ковалентно или нековалентно. Флуоресцентные метки имеют специальные реакционные группы, способные образовывать ковалентные связи с сульфгидрильными и аминокгруппами белка или с гистидиновыми аминокислотными остатками.

Дансилхлорид (1-диметиламинонафталин-5-сульфонилхлорид, *DNS-Cl*) широко используют в качестве метки для белков, особенно в тех случаях, когда проводят измерения поляризации ([рис. 2.39, а](#)). Это вещество имеет удобное время жизни флуоресценции ( $\sim 10$  нс). Максимум спектра поглощения *DNS-Cl* располагается при 350 нм, т. е. сдвинут в длинноволновую область по сравнению с областью собственного поглощения белков. На спектр испускания дансильной группы сильно влияет полярность растворителя, максимум этого спектра лежит около 520 нм.

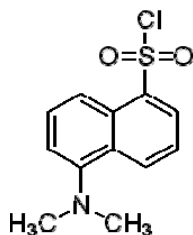
Производные родамина и флуоресцеина также активно используются в качестве экзогенных флуорофоров белков. Благодаря большим длинам волн поглощения и испускания этих красителей (около 480 и 560 нм соответственно) сведена к минимуму проблема фоновой флуоресценции биологических образцов (сравните с характеристиками природных флуорофоров в [табл. 2.3](#)). В отличие от дансильной группы, родамины и флуоресцеины не чувствительны к полярности растворителя, что также ставится им в заслугу.

В дополнение к вышесказанному заметим, что эти вещества имеют высокий коэффициент молярной экстинкции (около  $80\,000\text{ М}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ ). Создано большое число флуоресцентных меток на основе производных родамина и флуоресцеина. Например, йодоацетамиды и малеимиды

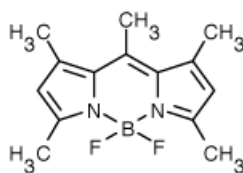
используются для связывания с сульфгидрильными группами белков, а изотиоционаты и сульфонилхлориды – для связывания с аминогруппами. Меченные флуоресцеином и родамином иммуноглобулины – коммерческие реактивы; их часто используют в флуоресцентной микроскопии и иммуноанализе. Эти красители очень подходят для количественного определения степени ассоциации небольших меченых молекул с белками на основании изменения поляризации флуоресценции.

В качестве альтернативы родаминам и флуоресцеинам сравнительно недавно была разработана серия красителей под торговой маркой *BODIPY*.

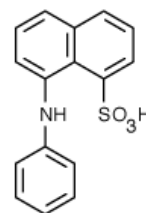
Основу структуры этих красителей составляет необычный флуорофор, содержащий атом бора ([рис. 2.39, б](#)). В зависимости от строения красители *BODIPY* могут иметь спектр испускания с максимумом при длине волны от 518 до 625 нм. Преимуществами этих красителей являются: высокие квантовый выход и коэффициент молярной экстинкции; нечувствительность к полярности растворителя и pH; меньшая, чем у родаминов и флуоресцеинов, полуширина спектров испускания. Недостатком флуорофоров данной серии признается очень маленький стоксов сдвиг (а значит, склонность к реабсорбции).



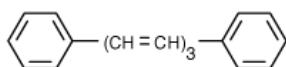
*a*



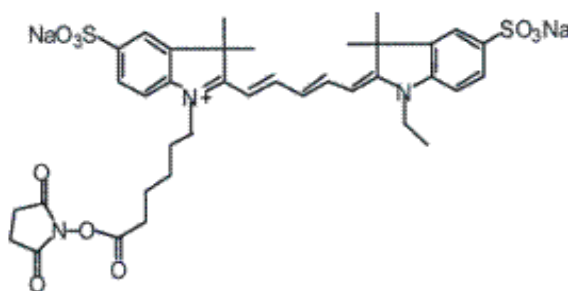
*б*



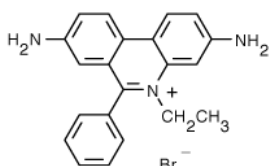
*в*



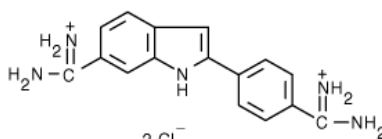
*г*



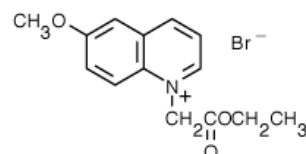
*д*



*е*



*ж*



*з*

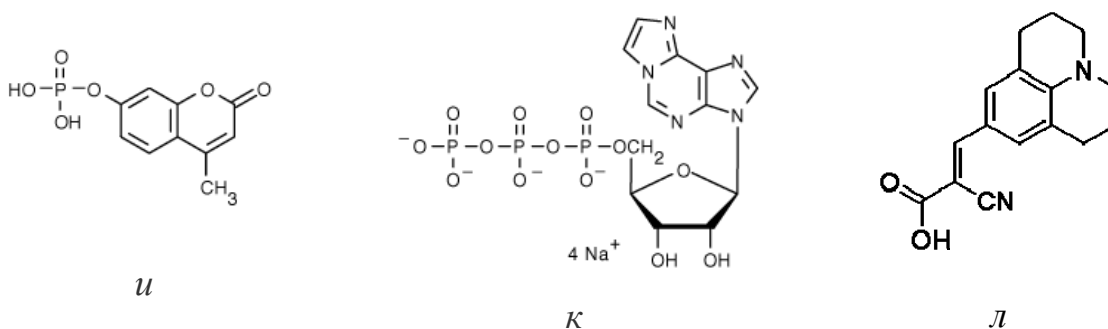


Рис. 2.39. Структура искусственных флуорофоров разных классов:

*a* – DNS-Cl; *б* – BODIPY 493/503; *в* – ANS; *г* – DPH; *д* – Cy 5; *е* – EtBr; *ж* – DAPI; *з* – MQAE; *и* – 7-UmP; *к* – ε-АТФ; *л* – CCVJ

Нафтиламинсульфоновые кислоты: 1-анилино-8-нафталинсульфоновая кислота (ANS), 2-*n*-толуидинилнафталин-6-сульфоновая кислота (TNS), и их производные часто используют в качестве нековалентно связанных зондов для белков и мембран (рис. 2.39, в). Эти зонды почти не флуоресцируют в воде, но интенсивно флуоресцируют либо при растворении в неполярных растворителях, либо когда они связаны с макромолекулами. Подобные флуорофоры связываются с сывороточными альбуминами, липопротеинами, апомиоглобином, иммуноглобулинами и липидными бислоями. Места связывания имеют, по-видимому, как полярную, так и неполярную природу.

### 2.12.2. Гидрофобные мембранные зонды.

Липиды обычно не флуоресцируют. Придание мембране флуоресцентных способностей заключается, как правило, в простой процедуре распределения нерастворимого в воде вещества внутри неполярной области мембраны. 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен (DPH) является наиболее часто используемым мембранным зондом (рис. 2.39, г). При смешивании этого флуорофора с суспензией мембран происходит практически полное связывание, и всякая люминесценция водной фазы DPH отсутствует. Незамещенные многоядерные ароматические углеводороды и DPH малочувствительны к полярности растворителя. Их используют в первую очередь для оценки внутренней вязкости двойных слоев по измерениям поляризации их флуоресценции. Путем целенаправленного изменения химического строения зонды могут быть локализованы на избранных участках мембраны. Одним из таких примеров является триметиламмониевая соль DPH (TMA-DPH). Полагают, что заряженный атом азота приводит к локализации TMA-DPH в области липидно-водной границы мембран.

Мембраны могут быть помечены и более гидрофильными веществами вроде родамина и флуоресцеина. В этом случае, чтобы «заставить»



флуорофоры встроиться в мембраны, их предварительно присоединяют к молекуле фосфолипида. В зависимости от того к какой части молекулы фосфолипида присоединился зонд, в мембране он будет локализован либо в гидрофобной части, либо в области липидно-водной границы. Примерами флуоресцирующих фосфолипидных аналогов могут служить флуоресцеин-фосфатидил-холин (*Fluorescein-PE*) и пиренил-фосфатидилэтаноламин (*Pyrenyl-PC*).

Существуют мембранные зонды, чувствительные к потенциалу мембраны. Несколько механизмов могут быть ответственны за изменение параметров флуоресценции таких молекул: изменение ориентации зонда или его локальной концентрации в мембране, влияние электрического поля на электронное распределение в зонде и другие. Например, карбоцианиновые красители обычно реагируют на изменение потенциала распределением и/или агрегацией в мембране, а стирильные красители, по-видимому, реагируют непосредственно на электрическое поле.

### 2.12.3. Длинноволновые зонды.

Флуоресценция зонда в красной или ближней инфракрасной области спектра – очень важное преимущество при исследовании биологических объектов. Это связано с тем, что такие зонды имеют также сдвинутую в длинноволновую область полосу поглощения. При возбуждении этих искусственных флуорофоров сводится к минимуму проблема фоновой флуоресценции биологических образцов, а значит, повышаются чувствительность методов, точность определения интересующего параметра. Длинноволновыми зондами являются цианиновые красители Cy 5, Cy 7, флуоресцирующие при длинах волн более 650 нм ([рис. 2.39, д](#)). Недостатком этих красителей считается маленький (около 30 нм) стоксов сдвиг, что, как уже упоминалось, обычно является причиной возникновения такого артефакта, как реабсорбция. Среди длинноволновых зондов присутствуют и производные родамина, и оксазиновые красители, фталоцианины и нафталоцианины.

### 2.12.4. Метки для ДНК.

Поскольку собственная флуоресценция ДНК слабоинтенсивная и располагается в ультрафиолетовой области спектра, ее трудно использовать для исследования динамики этой важной биологической макромолекулы. К счастью, существует большое количество флуоресцентных веществ, способных спонтанно связываться с ДНК, проявляя в связанном состоянии еще более интенсивную флуоресценцию. Наиболее широко используется для маркировки ДНК этидий бромид (EtBr) ([рис. 2.39, е](#)). Молекула EtBr имеет подходящие свойства: слабая люминесценция в воде, увеличение



интенсивности испускания в 30 раз после связывания с ДНК, возрастание времени жизни флуоресцентного состояния от 1,7 нс в водном растворе до 20 нс в связанном с двойной спиралью состоянии. Связывание EtBr с ДНК происходит через интеркаляцию (вклинивание) ароматического кольца молекулы флуорофора между основаниями двух спиралей. Многие метки для ДНК, в том числе и широко применяемый акридиновый оранжевый, связываются посредством интеркаляции. Флуорофоры другого типа, например 4,6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI), связываются с малой бороздкой ДНК (рис. 2.39, ж). Интенсивность люминесценции DAPI возрастает в наибольшей степени, когда молекула этого красителя связывается с участками ДНК, имеющими много АТ-пар нуклеотидов.

Сделать молекулу ДНК люминесцентной может также применение флуоресцирующих аналогов оснований. В качестве аналога аденина применяется 2-аминопурин, аналогом гуанина служит изоксантоптерин.

### 2.12.5. Флуоресцентные химические индикаторы.

Существует ряд флуоресцентных зондов, которые меняют свои спектрально-люминесцентные характеристики вследствие взаимодействия с биологически важными веществами, чаще ионами, такими как  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ . Такие зонды называют химически чувствительными индикаторами. Например, флуоресценция зонда *N*(метоксикарбонилфенил)-6-метоксихинолиниума (*MQAE*) подвергается тушению по динамическому механизму со стороны ионов хлора (рис. 2.39, з). Построение зависимости Штерна – Фольмера для такого тушения позволяет оценить концентрацию  $\text{Cl}^-$  в исследуемом образце. Востребованными зондами являются флуоресцентные индикаторы, чувствительные к ионам кальция. Например, у флуорофора под торговой маркой *Fura-2* в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  наблюдается смещение максимумов спектров люминесценции и возбуждения. По соотношению интенсивностей люминесценции при длинах волн, соответствующих несмещенному и смещенному максимумам определяют концентрацию ионов кальция. У другого зонда – *Calcium Green* – наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ , а смещение максимумов не происходит.

Флуоресцентные индикаторы найдены для многих видов молекул и ионов, включая  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , амины, фосфаты, а также для такого параметра, как pH среды.

Разработан целый ряд флуоресцентных красителей, которые используются в качестве меток макромолекул. *Dansyl chloride* (DNS-Cl), *fluorescein isothiocyanate* (FITC) эти соединения реагируют со свободными аминокгруппами белка, свет в голубой (DNS-Cl) или зеленой области (FITC).

1,8-*ANS* является чувствительной экзогенной пробой для исследования фолдинга белков. Флуоресценция 1,8-*ANS* увеличивается при упаковке белка (при переходе из полярной среды в неполярную).

### 2.12.6. Флуорогенные зонды.

Следующий класс искусственных флуорофоров составляют так называемые флуорогенные соединения. Эти вещества приобретают способность флуоресцировать только после того, как претерпевают некую модификацию. С помощью флуорогенных субстратов измеряют активность разных ферментов. Например, 7-умбелиферрил фосфат (7-*UmP*) используется для определения активности алкалинфосфатазы ([рис. 2.39, и](#)). 7-*UmP* начинает флуоресцировать после того, как произойдет отщепление фосфатного фрагмента, катализируемое алкалинфосфатазой. Таким образом, рост интенсивности фотолюминесценции в исследуемом объекте характеризует скорость накопления продукта ферментативной реакции.

Другой класс флуорогенных зондов обретает способность люминесцировать после связывания с аминок группами белков. Это явление используется для определения концентрации белков и низкомолекулярных пептидов.

Для изучения работы ферментов используется также следующий флуорогенный прием: белок связывается с двумя метками – флуорофором и тушителем. Пока белок цел, флуорофор не люминесцирует. Если происходит расщепление белка специальным ферментом (например протеазой) и флуорофор с тушителем оказываются на разных фрагментах исходного белка, то процесс тушения прекращается, и образец начинает флуоресцировать.

### 2.12.7. Структурные аналоги биомолекул.

Другим подходом к изучению функционирования нелюминесцирующих биологических объектов является создание структурных аналогов исследуемых молекул. Например, дегидроергостерол является флуоресцентным аналогом холестерина и характеризуется спектрами поглощения и испускания с максимумами при 325 и 390 нм соответственно. Этот аналог был использован для изучения взаимодействия стероидов с мембранами.

Как уже говорилось, многие коферменты способны люминесцировать в видимом диапазоне. Но дополнительно к этому были созданы флуоресцентные аналоги и аналоги нефлуоресцирующих лигандов.

Примером могут служить  $\epsilon$ -*АТР* (1, $N^6$ -этенoadенозин-5'-трифосфат) и лин-бензо-*АМР*, являющиеся производными *АТР* и *АМР* соответственно ([рис. 2.39, к](#)).

### 2.12.8. Зонды для определения вязкости.

Хотя квантовый выход флуоресценции веществ часто зависит от вязкости их микроокружения, существует не так много флуорофоров, которые называются зондами для вязкости. Один из них 9-(2-карбокси-2-циановинил)-юлолидин (*ССVJ*), склонный в возбужденном состоянии к процессам переноса заряда от amino- к виниловой группе ([рис. 2.39, л](#)). В среде с высокой вязкостью такой перенос заряда затрудняется, потому что молекула *ССVJ* не может принять изогнутую конформацию, необходимую для переноса заряда, и квантовый выход этого флуорофора значительно увеличивается. Такие зонды применяются для измерения микровязкости мембран, а также характеристик центров связывания ферментов.

Зондов для непосредственного определения вязкости липидных бислоев мало. Гораздо чаще этот параметр определяют по поляризации флуоресценции искусственного флуорофора (т. е. по скорости диффузного вращения молекулы), о чем говорилось в пункте 2 данного раздела.

### 2.12.9. Применение и выбор флуорофоров.

Из всего вышесказанного можно понять и широкий круг возможного использования зондов в медицине, науке и т. д. Так, например, можно изучать транспорт веществ через биологические мембраны, структурные перестройки, связанные с функционированием мембранных систем как *in vitro*, так и непосредственно в клетках и тканях. С помощью зондов-трассеров проводится диагностика циркуляции кровообращения (раствор двуназиевой соли флуоресцеина (ураин) – после введения через вену наблюдают желто-зеленую флуоресценцию губ и глаз), бактериальных инфекций и грибковых заболеваний (волосы флуоресцируют в желто-зеленом цвете при возбуждении 365 нм, яйца, зараженные сальмонеллой флуоресцируют ярко зеленым светом сквозь скорлупу). В экологических исследованиях с помощью зондов-трассеров осуществляют трассирование флуоресцирующим красителем сточных вод для определения области их распространения, направления подводных течений и т. д. Флуоресцируют канцерогенные углеводороды (3,4-бензопирен, дибензатрацен) в воздухе городов, дыме сигарет и др.; флуоресцируют нефтепродукты, флуоресцируют лекарства – хинин, гризольфульвин, антииотики и др.; флуоресцируют наркотики – морфин, героин и др. в количестве до 0,02 мкг в пробе.

Преимущества флуоресцентных меток над использованием радиоактивных меток: безопасность, дешевизна, высокая чувствительность. Важная особенность использования флуоресценции – прямая связь между

спектральными наблюдениями и молекулярными особенностями образцов. Легко визуализовать, как на спектральные свойства влияют локальное окружение хромофора, доступность к тушителю или присутствие рядом с акцептором.

Знания о хромофорах, их свойствах позволяют планировать эксперименты, которые позволят ответить на многие научные вопросы.

Дизайн и выбор флуоресцентных проб основан на биохимических и спектроскопических критериях. Биохимические критерии связаны с природой применений и образцом, а спектроскопические – с оборудованием и одновременной детекцией других флуорофоров. При выборе флуорофоров к ним предъявляются следующие требования: хорошие спектральные свойства, высокий коэффициент экстинкции, высокий квантовый выход флуоресценции, малый размер молекулы и легкость присоединения к биомолекулам.

## 2.13. Флуоресцентные белки

Как уже обсуждалось ранее, флуоресценция белков, как правило, обусловлена входящими в их состав ароматическими аминокислотами и связанными коферментами. Но существуют протеины, люминесцирующие и в более длинноволновой области спектра. К ним относятся фикобилипротеины, белки семейства зеленого флуоресцентного белка (*GFP*) и недавно изобретенные фитофлуоры. Флуоресценция белков видна невооруженным глазом, поэтому нет необходимости в разработке специальных методов детекции. Их функциональные параметры (спектр и эффективность флуоресценции) могут быть измерены и сравнены. Эти белки легко экспрессируются в гетерогенных системах, устойчивы к протеолизу и разным детергентам.

### 2.13.1. Фикобилипротеины.

Эти белки, выделенные из сине-зеленых и красных водорослей, интенсивно флуоресцируют при длинах волн более 500 нм. Флуорофором фикобилипротеинов является незамкнутая тетрапиррольная группа, называемая билином. Билины ковалентно привязаны к белкам четырех типов с молекулярными массами от 100 до 240 кДа. На каждую молекулу белка приходится от 6 до 34 билинов в зависимости от типа фикобилипротеина. Такая высокая концентрация флуорофоров обуславливает чрезвычайно высокий коэффициент молярной экстинкции – от 0,7 до  $2,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ . Другими достоинствами фикобилипротеинов являются: высокий квантовый

выход, длинноволновая область флуоресценции, хорошая растворимость в воде, большой Stokes сдвиг, стабильность при длительном хранении.

Благодаря этим свойствам фикобилипротеины широко используются в иммуноанализе, в проточной цитометрии (в качестве маркера) и в других областях. Использование этих белков в природных условиях (в качестве естественных флуорофоров) практически невозможно, потому что в составе организма они флуоресцируют слабо. Это объясняется осуществлением эффективной передачи (переноса) энергии с возбужденных фикобилипротеинов в фотосинтетические реакционные центры (такова их основная функция).

### 2.13.2. Белки семейства зеленого флуоресцентного белка.

Особое место среди биологических флуорофоров занимает зеленый флуоресцентный белок (*GFP* – *green fluorescent protein*) и родственные ему полипептиды.

Впервые *GFP* был выделен из биолюминесцентной медузы *Aequorea Victoria* более 30 лет назад. О том, какую роль играет этот белок в биолюминесцентных системах, будет рассказано позже, в параграфе, посвященном биолюминесценции. Здесь же достаточно упомянуть, что в природных условиях *GFP* работает как эффективный акцептор энергии возбуждения.

Уникальность *GFP* определяется строением его флуорофора. Этот белок не присоединяет к себе низкомолекулярную флуоресцирующую молекулу подобно, например, фикобилипротеинам. Флуорофор *GFP* образуется из трех его собственных аминокислотных остатков без участия внешних кофакторов за исключением молекулярного кислорода. Циклизация трех аминокислотных остатков, следующих друг за другом: серина (*Ser*-65), тирозина (*Tyr*-66) и глицина (*Gly*-67), сопровождается дегидратацией и дегидрогенированием. Это приводит к образованию флуорофора, 4-(*n*-гидроксiben-зилиден)-5-имидазолон, характеризующегося флуоресценцией с максимумом испускания около 500 нм (рис. 2.40, б). Оставшаяся часть аминокислотной цепи белка скручивается в подобие бочки или клетки, внутри которой помещается флуорофор (рис. 2.40, а).

Поскольку для синтеза флуорофора *GFP* не нужна никакая другая вспомогательная ферментативная система, получается, что цвет флуоресцентного белка кодируется только его геном. После открытия такого факта интерес к *GFP* чрезвычайно возрос, и в настоящее время этот белок и его мутанты являются наиболее широко используемыми генетическими маркерами. Соединяя ген *GFP* с генами других белков, стало возможно увидеть во флуоресцентном микроскопе места и скорость образования этих белков, проследить рост клеточных клонов, включая патогенные бактерии и раковые опухоли. Также стало возможным наблюдать за размножением в



подопытном организме разных вирусов, в том числе тех, которые содержат не ДНК, а РНК, т. е. ретровирусов, например иммунодефицита человека.

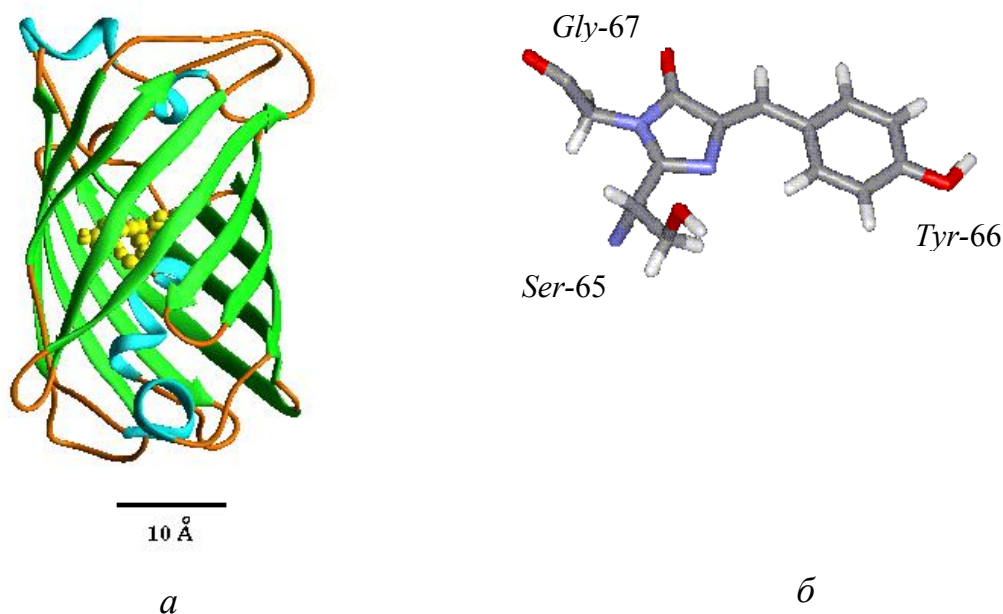


Рис. 2.40. Структура *GFP* (а) и его хромофора (б)\*

В настоящее время известно более 20 видов *GFP*, из которых наиболее изученными являются выделенные из медуз *A. Victoria* и так называемых морских огурцов *Renilla Reniformis*. Все известные *GFP* являются компактными глобулярными молекулами с массой мономера примерно 27 кДа. Одним из замечательных свойств *GFP* является его высокая стабильность. На флуоресценцию *GFP* практически не оказывают влияние такие классические тушители, как акриламид, галогены и молекулярный кислород. В слабощелочных растворах (рН 8,0) максимум возбуждения для *GFP* из *A. Victoria* и *R. reniformis* находится при 395 и 498 нм (с плечом при 470 нм), а максимум флуоресценции при 509 и 508 нм соответственно.

После того как был клонирован *GFP* из медуз, возникла необходимость обогатить палитру применяемых цветных маркеров, чтобы в одном опыте метить флуоресцентными метками сразу несколько генов. Поиск разноцветных флуоресцентных белков увенчался успехом. Несколько десятков таких белков были найдены коллективом российских исследователей, но уже не в биoluminescentных организмах, а в разных видах несветящихся кораллов. Так, в 1999 году было выделено и клонировано шесть новых флуоресцирующих белков, два из которых значительно отличались от *GFP* по спектральным свойствам, обнаруживая флуоресценцию в желтой и красной области спектра. Наиболее интересными из новых белков являются желтый (*zFP538*) и красный (*drFP583*, или *DsRed*)

\* Источник: <http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C08/C08Links/pp99.cryst.bbk.ac.uk/projects/gmocz/gfp.htm>

– белки, выделенные из кораллов рода *Zoanthus* и *Discosoma* соответственно. Новые цветные белки имеют форму, аналогичную бочонку (впервые обнаруженную для *GFP*). Сравнение аминокислотного состава показало, что эти белки имеют только 20–30 % общей с *GFP* последовательности. При этом структура бочонка в целом одинакова, так как ключевые моменты вторичной структуры *GFP* сохраняются и для новых белков. Так, например, в высшей степени консервативны участки, образующие «дно» и «крышку» бочонка. К настоящему времени красный белок, *DsRed* довольно хорошо изучен, поскольку он представляет особый интерес в связи со смещением спектров в длинноволновую область. Максимум флуоресценции этого белка располагается при длине волны 583 нм (для *GFP* это 509 нм, у известных мутантов *GFP* наибольшее значение 529 нм). Сильное смещение спектра флуоресценции в красную область уменьшает проблемы, связанные с существованием фоновой флуоресценции биологических тканей. По своим спектральным характеристикам *DsRed* является хорошим акцептором при индуктивно-резонансном переносе энергии от донора *GFP*. Введение нового красного цвета флуоресценции в палитру уже используемых цветов (зеленого, желтого, голубого) расширяет возможности многоцветных измерений с использованием одновременно нескольких цветных белков в качестве флуоресцентных меток. В настоящее время спектральный диапазон флуоресценции цветных *GFP*-подобных белков и их мутантов простирается почти на 180 нм от голубого пика при 460 до 640 нм в красной области спектра ([прил. 4](#)).

### 2.13.3. Фитофлуоры.

Сравнительно недавно был изобретен еще один тип флуоресцентных белков, названных фитофлуорами. За основу была взята структура фитохрома – фоторегуляторного белка растений. Фитохромы состоят из белковой глобулы, соединенной с низкомолекулярной «антенной» – незамкнутой тетрапиррольной группой, и в обычном состоянии не флуоресцируют. Но если заменить хромофор фитохрома на билин из определенного фикобилипротеина, то получается белок, ярко флуоресцирующий в красной области спектра (около 600 нм). Квантовый выход флуоресценции фитофлуоров составляет около 0,7. Фитофлуоры демонстрируют высокое значение анизотропии флуоресценции, что выгодно их отличает от фикобилипротеинов. Это объясняется тем, что молекула фитофлуора имеет только один билин.



Фитофлуоры так же как и *GFP*-подобные белки, могут быть использованы для контроля экспрессии генов, поскольку флуоресцентная форма этого белка формируется самостоятельно (при наличии в среде подходящего билина).

## 2.14. Процессы, изучаемые с помощью флуоресценции

Возможности применения флуорофоров при изучении белков, нуклеиновых кислот и мембранных структур клетки очень широки. Возможности использования анизотропии флуоресценции, резонансного переноса энергии процессов, тушения люминесценции для исследования структуры и динамики биологических макромолекул.

### 2.14.1. Тушение люминесценции.

Тушением флуоресценции называют любые процессы, которые уменьшают интенсивность флуоресценции данного вещества. Тушение люминесценции может дать важную информацию о месте расположения флуорофора и его микроокружении. Как известно, существует большое количество нефлуоресцирующих молекул и ионов, способных играть роль тушителей. К ним относятся ионы йода ( $I^-$ ), молекулы кислорода и акрилаида. Доступность флуорофоров для таких тушителей может быть использована для выяснения локализации флуорофоров в макромолекулах и мембранах и их проницаемости для тушителей. Общий принцип этого метода представлен на [рис. 2.41](#).

### 2.14.2. Перенос энергии.

Флуоресцентный перенос энергии (*RET* или *FRET* в англоязычной литературе) – это перенос энергии возбужденного состояния от донора *D* к акцептору *A*. Он происходит без промежуточного испускания фотона и является в основном результатом диполь-дипольных взаимодействий между донором и акцептором.

Скорость переноса энергии зависит от степени перекрытия спектра испускания донора со спектром поглощения акцептора, относительной ориентации дипольных моментов переходов и расстояния между молекулами. Зависимость от последнего параметра привела к многочисленным применениям переноса энергии в биофизических и

биохимических исследованиях. Фёрстеровский радиус (расстояние, начиная с которого эффективность переноса становится более 50 %) для биохимических  $D-A$ -пар находится в пределах 15–60 Å. Этот диапазон расстояний сравним с диаметром большинства белков и толщиной биологических мембран.

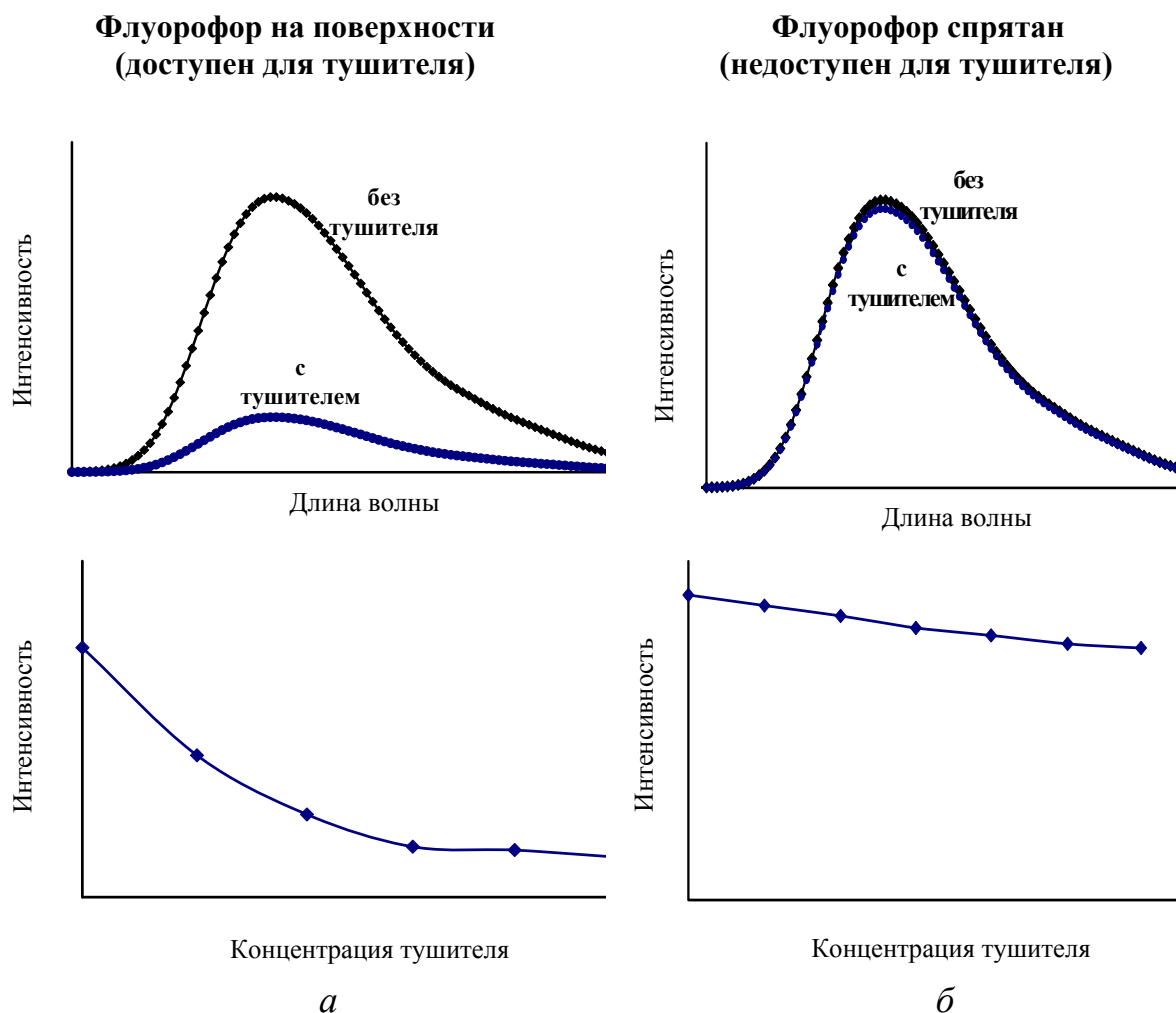


Рис. 2.41. Влияние локализации флуорофора на характеристики его флуоресценции в присутствии тушителя\*

Любые явления, которые оказывают влияние на расстояние  $D-A$ , влияют на скорость переноса энергии, что позволяет их количественно охарактеризовать. Например, измерение переноса энергии было использовано для оценки: расстояния между связывающими центрами белков; расстояния между флуорофорными группами белков и другими, связанными с мембранами, хромофорами; латеральной ассоциации мембранных компонентов; реакций ассоциации между макромолекулами. В этих приложениях используется эффективность переноса энергии между

\* Адаптировано из Lakowicz J. R., Principles of fluorescence spectroscopy. Kluwer Academic/Plenum Publishers: N.Y., 1999. – 495 p.

фиксированными донорами и акцепторами для установления расстояния между ними.

### 2.14.3. Поляризация и анизотропия флуоресценции.

При возбуждении поляризованным светом испускание флуоресцирующего образца также частично поляризовано, что является результатом фотоотбора флуорофоров в соответствии с их ориентацией по отношению к направлению поляризации возбуждающего излучения. Испускание может быть деполяризовано по ряду причин, относительный вклад которых зависит от исследуемого образца. Одна из общих причин деполяризации – вращательная диффузия флуорофоров. В жидких невязких средах флуорофоры, как правило, успевают повернуться вокруг своей оси несколько раз за время жизни флуоресцентного состояния, поэтому их излучение деполяризовано (т. е. анизотропия их флуоресценции близка к нулю). Величина поляризации или анизотропии флуоресценции отражает среднее угловое смещение флуорофора, которое происходит за время между поглощением и испусканием фотона. Оно зависит от скорости вращательной диффузии, которая описывается такой величиной, как время вращательной корреляции  $\theta$ :

$$\theta = \frac{\eta \cdot V}{R \cdot T},$$

где  $\eta$  – вязкость микроокружения,  $V$  – молекулярный объем вращающейся молекулы,  $R$  – универсальная газовая постоянная,  $T$  – температура.

Отсюда две основные цели исследования поляризации и анизотропии флуоресценции разных биологических объектов:

- а) измерение вязкости (растворителя, мембраны, микроокружения в центре связывания белка и т. п.);
- б) регистрация изменения объема вращающейся частицы (при денатурации белков, ассоциации белков между собой и с лигандами, связывании субстратов и т. п.).

Кроме того, на степень поляризации излучаемого образцом света могут влиять процессы переноса энергии между флуорофорами, а значит, данный метод является инструментом для исследования и этих процессов.

## ГЛАВА 3. МЕХАНИЗМЫ ТРАНСФОРМАЦИИ И ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ В ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

### П л а н   г л а в ы

[3.1. Межмолекулярный перенос энергии и электрона. Миграция энергии. Скорости дезактивации возбужденных состояний.](#)

[3.2. Перенос энергии по индуктивно-резонансному механизму.](#)

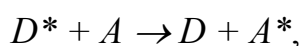
[3.3. Перенос энергии по обменно-резонансному механизму](#)

[3.4. Миграция экситона, полупроводниковая миграция энергии, фотопроводимость, роль ловушек.](#)

[3.5. Физические методы изучения переноса энергии.](#)

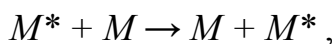
### 3.1. Межмолекулярный перенос энергии и электрона. Миграция энергии. Скорости дезактивации возбужденных состояний

Процессы переноса энергии играют исключительно важное значение в фотохимии биологических процессов. Под миграцией энергии понимается безызлучательный обмен энергией между электронно-возбужденной молекулой (донором) и молекулой в основном состоянии (акцептором):

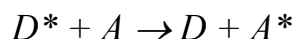


где  $D$  – флуоресцентная молекула, выступающая в данном случае в качестве донора энергии для молекулы акцептора  $A$ .

Миграция энергии может происходить как между одинаковыми



так и между разными молекулами



в направлении от более высокого к более низкому или одинаковому энергетическому уровню.

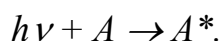
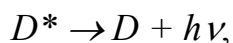
Различают также внутримолекулярную и межмолекулярную миграции энергии.

В результате протекания таких процессов возбужденная молекула донора  $D^*$  переходит в основное состояние, передавая свою энергию молекуле акцептора  $A$ , которая при этом становится возбужденной.

Очевидно, что эффективность такого переноса энергии будет определяться степенью перекрытия спектра испускания донора и поглощения акцептора, квантовым выходом испускания и коэффициентом молярного поглощения и концентрацией акцептора. В том случае, когда спектры поглощения и испускания молекул  $D$  перекрываются, излучательным путем может происходить миграция энергии. Излучательный перенос энергии к молекулам, находящимся в основном состоянии, ограничивается случаями синглет-синглетного и триплет-синглетного переноса, когда мультиплетность акцептора не изменяется.

Полученную энергию молекула акцептора может испустить в виде кванта люминесценции, либо использовать в фотохимической реакции, либо, наконец, просто растратить в тепло.

Хотя перенос электронной энергии может осуществляться излучательно и безызлучательно, под миграцией энергии понимается безызлучательный перенос энергии возбужденного состояния от донора к акцептору, который происходит без промежуточного испускания фотонов. Процесс простого испускания и перепоглощения фотонов называется тривиальной абсорбцией (*trivial absorption*). Молекула акцептора в этом случае не влияет на характеристики излучения первой молекулы, например, не изменяет время жизни ее флуоресцентного состояния молекулы донора. Схематически процесс тривиальной абсорбции можно представить как двухстадийный процесс:



Скорость переноса энергии в данном случае зависит от квантового выхода флуоресценции молекулы донора  $D$ , концентрации молекул акцептора  $A$ , способности абсорбировать свет молекулой  $A$ , т. е. от ее коэффициента экстинкции, перекрытия спектра испускания донора  $D$  со спектром поглощения акцептора  $A$ . Математически перекрытие спектров характеризуют интегралом перекрытия спектров  $J$ :

$$J = \int_0^{\infty} I_D \varepsilon_A d\nu,$$

где  $I_D$  – интенсивность испускания донора;  $\varepsilon_A$  – коэффициент молярной экстинкции акцептора. Обе величины являются функцией энергии,

выраженной в обратных сантиметрах ( $\bar{\nu}$ ,  $\text{см}^{-1}$ ), и нормированы таким образом, что полное перекрытие соответствовало бы  $J=1$ .

Чем больше величина указанных четырех характеристик, тем эффективнее тривиальная абсорбция. В случае если донор и акцептор энергии – молекулы одного вида, процесс называется реабсорбцией. Излучательный перенос зависит от менее интересных оптических свойств образца, таких как размер кюветы с образцом, оптические плотности образца на длинах волн возбуждения и флуоресценции и точная геометрия пучков возбуждающего и испускаемого света.

В противоположность этим тривиальным факторам безызлучательный перенос энергии содержит богатую информацию, касающуюся подробностей строения молекул донорно-акцепторных пар. Миграция энергии – чисто физический процесс, не сопровождающийся химическим изменением вещества, определяется природой взаимодействия между донором и акцептором. Миграция энергии не связана ни с испусканием фотона донором и его поглощением акцептором, ни с обменом электронами или атомами между взаимодействующими частицами. Рассмотрим механизмы миграции энергии: индуктивно-резонансный, обменно-резонансный, экситонный, полупроводниковый (зонная проводимость).

### 3.2. Перенос энергии по индуктивно-резонансному механизму

Перенос энергии по индуктивно-резонансному механизму – результат электромагнитного взаимодействия частиц, безызлучательный перенос энергии происходит в результате диполь-дипольного взаимодействия между донором и акцептором, он не является простым испусканием и перепоглощением фотонов и представляет собой «действие на расстоянии» (другие названия индуктивно-резонансного механизма – дипольные взаимодействия, *Coulombic interaction*).

При реализации этого механизма миграции энергии взаимодействие происходит через электромагнитное поле (на больших расстояниях – 20–100 Å) и не требует физического контакта взаимодействующих частиц. Процесс включает индуцирование дипольных осцилляций в молекуле  $A$  молекулой  $D^*$ . Экспериментально этот механизм можно отличить от тривиальной абсорбции по уменьшению времени жизни флуоресценции молекулы донора  $D$  в присутствии молекулы акцептора  $A$ . Причем этот процесс осуществляется при слабых энергиях взаимодействия между молекулами, значения которых составляют порядка  $10^{-3}$  эВ.

Если в начальный момент времени колеблется только один осциллятор, то в дальнейшем происходит перекачка энергии в другой осциллятор, и осцилляторы обмениваются энергией, пока колебания не затухнут ([рис. 3.1](#)). Экспериментальные значения расстояния индуктивно-резонансного переноса

достигают 5 нм. Механический аналог индуктивно-резонансного механизма представлен на [рис. 3.2](#).

Теория концентрационного тушения в результате индуктивно-резонансного переноса энергии в России была предложена С. И. Вавиловым. Далее теорию Вавилова развил Левшин. Он показал, что в большинстве случаев концентрационное тушение обусловлено переносом энергии от возбужденных молекул к нелюминесцирующим (или люминесцирующим в другой области спектра) димерам. Позднее было установлено, что тушение люминесценции поглощающими веществами связано с перекрытиями спектров испускания донора и поглощения акцептора. Также было установлено, что при наличии процессов тушения уменьшается время жизни возбужденного состояния.

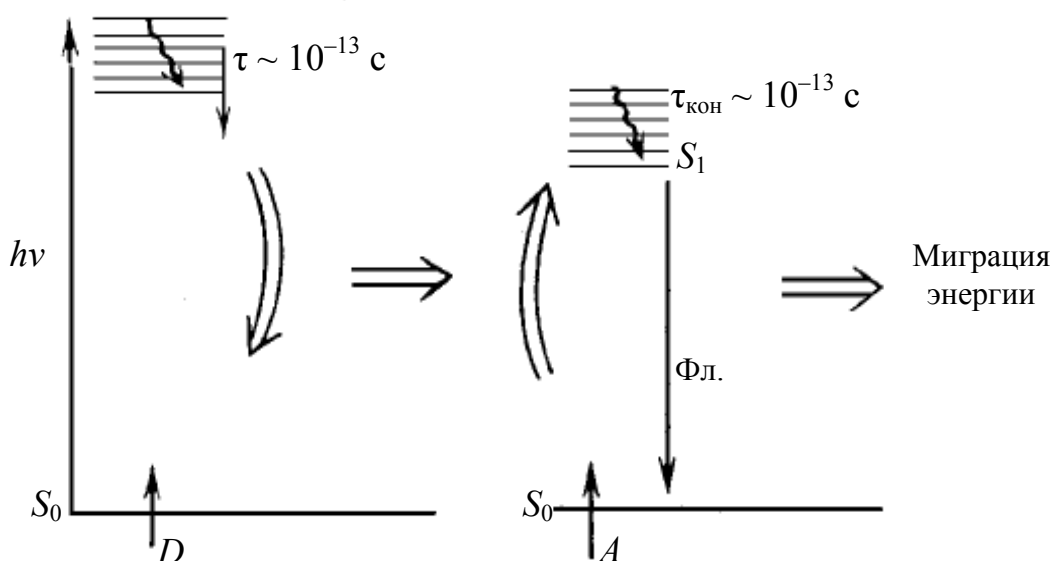


Рис. 3.1. Схема миграции энергии электронного возбуждения

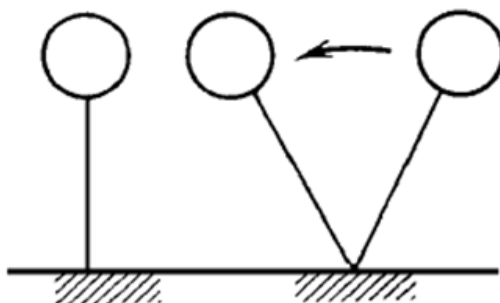


Рис. 3.2. Механический аналог индуктивно-резонансного механизма

В теории концентрационного тушения Вавилова уравнение, связывающее тушение люминесценции с различными физико-химическими факторами, имеет вид



$$\frac{I_0}{I} = e^{wN_A C} (1 + 4\pi\sigma W\tau_0 D N_A C) \delta,$$

где  $I_0$  – выход люминесценции в отсутствии тушителя;  $I$  – выход люминесценции в присутствии тушителя;  $\frac{I_0}{I}$  – относительный выход люминесценции;  $w$  – объем сферы действия возбужденной молекулы за вычетом ее кинетического объема;  $N_A$  – число Авогадро;  $W$  – вероятность тушения при столкновении частиц тушителя и люминофора;  $\tau_0$  – длительность возбужденного состояния при отсутствии тушителя;  $D$  – коэффициент диффузии,  $\sigma$  – радиус действия возбужденной молекулы;  $C$  – концентрация тушителя;  $\delta$  – поправочный множитель.

Удовлетворительная теория переноса энергии в конденсированной среде была развита Ферстером. В ней предполагалось, что перенос энергии происходит благодаря слабому диполь-дипольному взаимодействию между молекулами донора и акцептора, не изменяющему первоначальные оптические спектры молекул. Предполагалось также, что время жизни возбуждения в акцепторе меньше, чем время обратного переноса. В результате переноса энергии может наблюдаться либо сенсibilизация (увеличение выхода), либо тушение люминесценции.

Для пояснения эффекта диполь-дипольного переноса энергии обычно пользуются моделью колебаний двух гармонических осцилляторов (например связанных маятников) с одинаковыми собственными частотами. Если в начальный момент времени колеблется только один осциллятор, то в дальнейшем происходит перекачка энергии в другой осциллятор, и осцилляторы обмениваются энергией, пока колебания не затухнут. Экспериментальные значения расстояния индуктивно-резонансного переноса достигают 5 нм.

В теории Ферстера – Галанина относительный выход флуоресценции описывается формулой

$$\frac{I}{I_0} = 1 - \sqrt{\pi} b \exp(b^2) \left(1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^b \exp(-x^2) dx\right),$$

где  $b = \frac{\sqrt{\pi} C_A}{2C_0}$ ;  $C_0 = \frac{4}{3\pi} R_0$ ;  $C_A$  – концентрация флуоресцентных молекул;  $C_0$  – критическая концентрация переноса, характерная для данной пары донора и акцептора, при которой вероятность флуоресценции равна вероятности переноса;  $R_0$  – *фёрстеровский радиус*.

Обычно концентрации, при которых потушена половина молекул, при различных условиях составляют  $10^{-2}$ – $10^{-3}$  моль/л, что связано с характеристическими радиусами  $R_0 = 2$ –6 нм.

Константа скорости переноса энергии по индуктивно-резонансному механизму  $k_{\text{инд-рез}}$  определяется следующим выражением:

$$k_{\text{инд-рез}} = k \frac{\kappa^2 k_D^0}{R_{DA}^6} J(\epsilon_A)$$

Константа  $k$  в данном выражении определяется условиями эксперимента, такими как коэффициент преломления среды и концентрация. Величина  $\kappa^2$  учитывает тот факт, что взаимодействие между двумя диполями зависит от их ориентации в пространстве. Для случайного распределения взаимодействующих диполей  $\kappa^2$  является константой, равной  $2/3$ . Член  $J(\epsilon_A)$  близок интегралу перекрывания спектров  $J$  с тем лишь отличием, что включает коэффициент экстинкции акцептора  $\epsilon_A$ .

Условия индуктивно-резонансного механизма требуют выполнения 3 правил Ферстера:

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

2. Спектр флуоресценции  $D$  должен перекрываться со спектром поглощения  $A$ , так как вероятность определяется степенью перекрывания спектра испускания донора и поглощения акцептора (рис. 3.3). Эффективность миграции пропорциональна интегралу (площади) перекрытия, поэтому чем больше одинаковых частот для переходов  $D^* \rightarrow A$  и  $A \rightarrow D^*$ , тем больше вероятность резонанса.

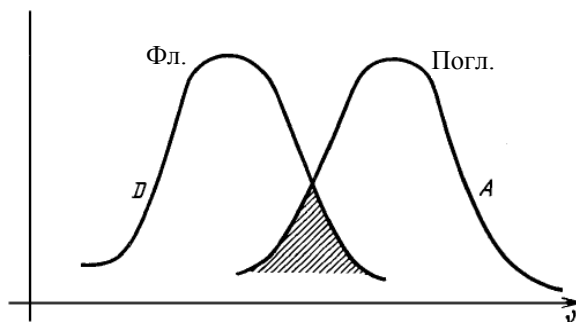


Рис. 3.3. Перекрытие спектров флуоресценции донора  $D$  и поглощения акцептора  $A$

3. Пара  $D^*$  и  $A$  должна быть разделена определенным расстоянием  $R$ , которое не изменялось бы за время жизни возбужденного состояния донора.

При индуктивно-резонансном механизме вероятность миграции прямо пропорциональна квадрату энергии взаимодействия  $E$ , который в свою очередь имеет следующую связь с  $R$ :  $E \sim R^{-3}$ , тогда квадрат энергии взаимодействия  $E^2 \sim R^{-6}$ . Скорость переноса при индуктивно-резонансном механизме составляет  $10^6$ – $10^{11}$  с $^{-1}$ .

Если просуммировать все вышесказанное, то к основным условиям реализации индуктивно-резонансного механизма можно отнести:

- условие резонанса:  $\Delta E_A = \Delta E_D$  между определенными энергетическими уровнями;
- условие индукции: интенсивные взаимодействия между  $A$  и  $D$ .

Примерам донорно-акцепторных пар, в которых осуществляется индуктивно-резонансная миграция энергии, являются: ароматические аминокислоты белка – офикобилины (фикоэритрин и фикоцианин, являющиеся фотосинтетическими пигментами красных и сине-зеленых водорослей), хлорофилл  $b$  – хлорофилл  $a$ , тирозин – триптофан, триптофан – триптофан, ароматические аминокислоты – краситель в комплексах белок – краситель и др.

### 3.3. Перенос энергии по обменно-резонансному механизму

В ряде случаев перенос энергии определяется не диполь-дипольным, а *обменно-резонансным механизмом* – *collision mechanism*, т. е. осуществляющимся в результате столкновений. Например, перенос с участием триплетных состояний происходит по обменному механизму.

В случае обменных взаимодействий предполагается, что электронные облака донора и акцептора энергии значительно перекрываются в пространстве. В области перекрывания может происходить обмен электронами. Эффективность переноса определяется перекрытием волновых функций и экспоненциально зависит от расстояния между молекулами, так как электронная плотность обычно уменьшается экспоненциально с ростом расстояния от ядра атома. Теория переноса энергии в результате обменно-резонансного взаимодействия была разработана Д. Л. Декстером, который предложил выражение для константы скорости переноса энергии:

$$k_{(\text{обмена})} = KJ \exp(-2R_{DA}/L),$$

где константа  $K$  определяется спецификой орбитальных взаимодействий, т. е. зависит от природы взаимодействующих частиц;  $J$  – интеграл спектрального перекрывания, нормированный на коэффициент экстинкции акцептора  $\varepsilon_A$ ;  $R_{DA}$  – расстояние между донором и акцептором, которое нормируется на их ван-дер-ваальсовские радиусы  $L$ . Важно отметить, что величина  $J$ , нормированная на экстинкцию  $\varepsilon_A$ , не зависит от величины этой экстинкции, т. е.  $k_{(\text{обмена})}$  не должна зависеть от поглощения акцептора. Этот факт отличает константу скорости переноса энергии по обменному механизму от аналогичной константы для индуктивно-резонансного (дипольного) переноса ( $k_{(\text{инд-рез})}$ ).

Отличие выражений для констант скорости индуктивно-резонансного и обменного переноса энергии ( $k_{\text{(обмена)}}$  и  $k_{\text{(инд-рез)}}$ ) определяет следующие дополнительные различия указанных механизмов переноса.

1. Скорость индуктивно-резонансного переноса энергии уменьшается в зависимости от  $R^{-6}$ , в то время как скорость обменного переноса уменьшается по экспоненте в зависимости от  $\exp(-2R/L)$ . Это означает, что  $k_{\text{(обмена)}}$  делается пренебрежимо малым с ростом  $R$  до величин, более чем на порядок превышающих один или два диаметра молекул (5–10 Å).

2. Скорость индуктивно-резонансного переноса энергии зависит от силы осциллятора излучательных переходов  $D^* \rightarrow D$  и  $A \rightarrow A^*$ . Скорость обменно-резонансного переноса энергии не зависит от силы осциллятора этих переходов.

3. Эффективность переноса энергии для индуктивно-резонансного механизма ( $k_{\text{(инд-рез)}}/k_D$ ), где  $k_D$  – константа скорости излучательного перехода донора) зависит от силы осциллятора перехода  $A \rightarrow A^*$  и от квантового выхода флуоресценции донора  $\Phi_D$ . Эффективность переноса энергии для обменно-резонансного механизма ( $k_{\text{(обмена)}}/k_D$ ) не связана непосредственно с экспериментально измеряемыми характеристиками.

Основные закономерности, определяющие внутримолекулярный безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения по уровням электронно-возбужденных состояний, являются справедливыми также и для межмолекулярного безызлучательного переноса электронного возбуждения, совершаемого по обменно-резонансному механизму. В этом случае молекулы донора ( $D$ ) и акцептора ( $A$ ) следует рассматривать как единую систему, состоящую из двух подсистем, связанных между собой более слабой связью, чем отдельные их фрагменты. В системе  $D + A$  существуют два конкурирующих канала переноса энергии электронного возбуждения – внутри- и межмолекулярные.

Такой подход является более общим и позволяет установить связь между внутри- и межмолекулярными безызлучательными процессами переноса энергии электронного возбуждения, которые необходимо рассматривать с единой точки зрения, а именно на основе принципа относительного расположения уровней энергии электронно-возбужденных состояний разной орбитальной природы и мультиплетности.

Еще сложнее обстоит дело с тушением хемилюминесценции и биолуминесценции. Отсутствуют теоретические модели, пригодные для обработки результатов. Применение теории, разработанной для фотолуминесценции, осложняется наличием химического возбуждения.

Ингибирование хемилюминесценции и биолуминесценции может осуществляться на стадиях, предшествующих образованию электронно-возбужденных состояний. Для биолуминесценции это может быть процесс связывания посторонних соединений с активными группами фермента или взаимодействие с субстратами реакции.

Вместе с тем для хеми- и биолюминесценции в присутствии экзогенных соединений, как и для фотолуминесценции, характерны как тривиальная абсорбция, так и тушение в результате межмолекулярного переноса энергии. На [рис. 3.4](#) схематически изображены электронно-возбужденные состояния эмиттера биолюминесценции и соединений в реакционной смеси (этими соединениями могут являться как посторонние молекулы, так и подходящие для этого субстраты реакции) и перенос энергии между этими структурами.

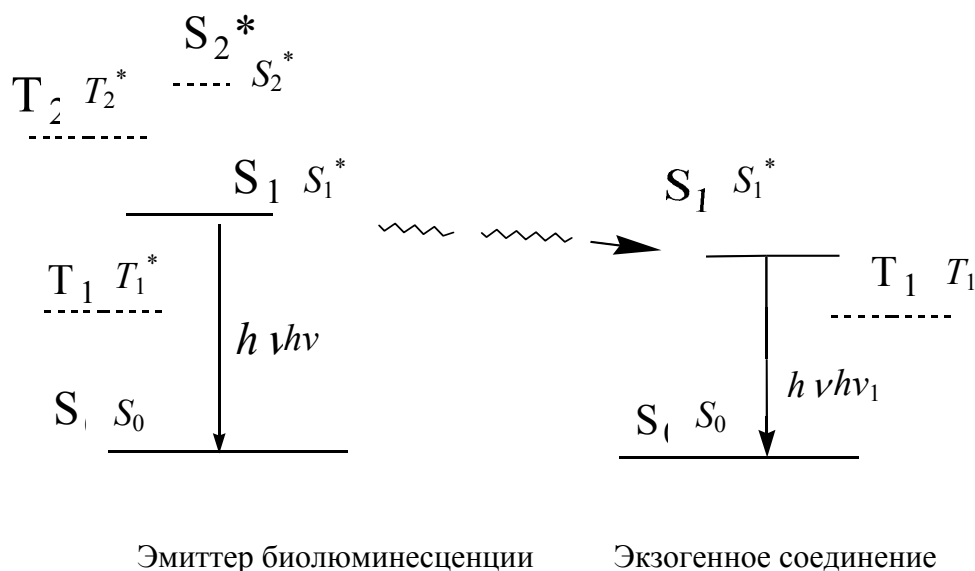


Рис. 3.4. Перенос энергии с электронно-возбужденных состояний биолюминесценции

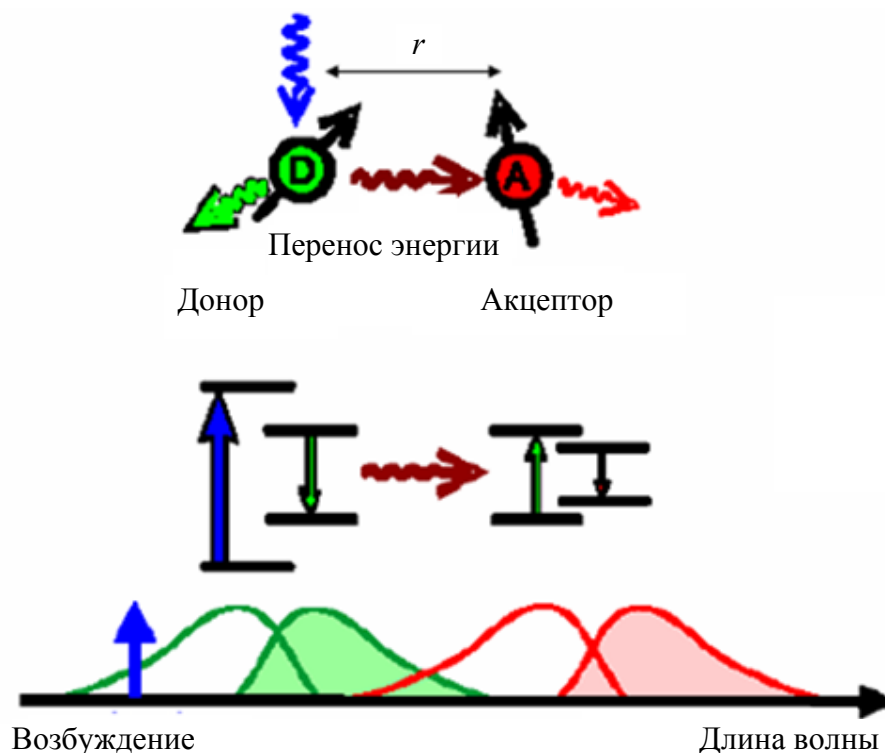


Рис. 3.5. Схематическое изображение флуоресцентного резонансного переноса энергии

Если в биолюминесцентном процессе заселяются и высшие электронно-возбужденные состояния эмиттера (на [рис. 3.4](#) изображены второе синглетное и триплетное состояния), они также могут являться донорами энергии возбуждения. В этом случае в результате межмолекулярного переноса энергии могут заселяться возбужденные состояния соединений большей энергии.

С ростом концентрации молекул все большую роль в уменьшении выхода люминесценции начинает играть образование ассоциатов. Это в первую очередь нелюминесцентные ассоциаты с участием эмиттера биолюминесценции. Образование ассоциатов можно рассматривать как образование нестойких соединений. При этом происходит перераспределение электронной плотности между двумя исходными соединениями и связанное с этим расщепление уровней взаимодействующих состояний, нижний из которых чаще всего нелюминесцентный.

Резонансный перенос энергии (*FRET* или *RET*) содержит информацию о реакциях возбужденных состояний, тушении флуоресценции, анизотропии флуоресценции, релаксации в растворе ([рис. 3.5](#)).

Резонансный перенос энергии зависит от взаимодействия флуорофора с окружающими его молекулами. Резонансный перенос энергии происходит между аминокислотными остатками. Такой перенос происходит благодаря перекрытию спектров поглощения и испускания фенилаланина, тирозина, триптофана.



### 3.4. Миграция экситона, полупроводниковая миграция энергии, фотопроводимость, роль ловушек

Как и при индуктивно-резонансном переносе, экситонный перенос возникает вследствие электрических, диполь-дипольных взаимодействий между молекулами и ионами. Однако экситонный перенос предполагает более интенсивные межмолекулярные взаимодействия. Вследствие этого вероятность обмена энергией между соседними молекулами неизмеримо возрастает: время обмена составляет  $10^{-12}$ – $10^{-14}$  с. Возбуждение осуществляется при больших энергиях взаимодействия  $10^{-2}$  эВ, а зависимость энергии взаимодействия от  $R$  обратно пропорциональна кубу –  $R^{-3}$ . Область возбуждения, включающая большое число молекул-пар электрон – дырка, – *экситон*. Возбуждение в этом случае носит коллективный характер (рис. 3.6). Возбуждение как бы бежит по верхним колебательным уровням взаимодействующих молекул.

При реализации полупроводниковой миграции энергии в биологических системах энергия переносится с помощью относительно свободных перемещающихся зарядов. При изменении электропроводности полупроводников под действием электромагнитного излучения возникает дополнительная проводимость, которую называют *фотопроводимостью*. Явление фотопроводимости широко используется для установления полупроводниковых свойств и способности к зонной миграции энергии исследуемых объектов, в том числе и биологических.

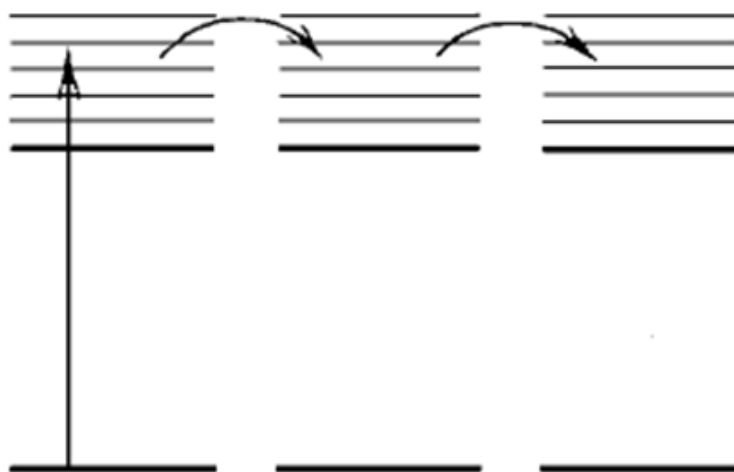


Рис. 3.6. Схема экситонного переноса энергии

Согласно зонной теории валентная зона у полупроводников при температуре  $T = 0$  °К полностью занята электронами, а зона проводимости свободна (как у диэлектриков). Ширина запрещенной зоны  $\Delta W_u$  полупроводников составляет  $\sim 0,01$ – $1$  эВ. Если приложить разность потенциалов к такому кристаллу, то ток в нем не возникает, так как в зоне



проводимости нет свободных носителей заряда. А энергии, которую сообщает внешнее электрическое поле электронам, недостаточно для переброса их из валентной зоны в зону проводимости. Дополнительную энергию, необходимую для преодоления запрещенной зоны, электроны могут получить при нагревании кристалла либо при облучении его светом (фотоэффект). В последнем случае электроны получают энергию от поглощения квантов излучения (фотонов). При этом энергия фотона  $h\nu$  должна быть равна или больше ширины запрещенной зоны:

$$h\nu \geq \Delta W,$$

где  $\nu$  – частота излучения;  $h$  – постоянная Планка.

Поглотив фотон, электрон из валентной зоны переходит в зону проводимости (рис. 3.7, а). На его месте в валентной зоне образуется положительно заряженная дырка. Таким образом, каждый фотон освобождает пару электрон – дырка. Под действием внешнего электрического поля электроны и дырки в кристалле движутся упорядоченно (дырки вдоль поля, электроны против поля), обеспечивая собственную проводимость. Концентрация пар электрон – дырка, а следовательно, и фототок пропорциональны числу фотонов, падающих на единицу поверхности кристалла за единицу времени, т. е. интенсивности света. У некоторых полупроводников и без освещения при комнатной температуре в зоне проводимости может находиться небольшое число термически возбужденных электронов. Они будут создавать темновую проводимость полупроводника и темновой ток. Если частота  $\nu$  падающего света такова, что энергия фотона  $h\nu < \Delta W$ , то фотоэффект не наблюдается. Граничная частота  $\nu_0$ , ниже которой фотоэффект не наблюдается, называется красной границей фотоэффекта (или фотопроводимости).

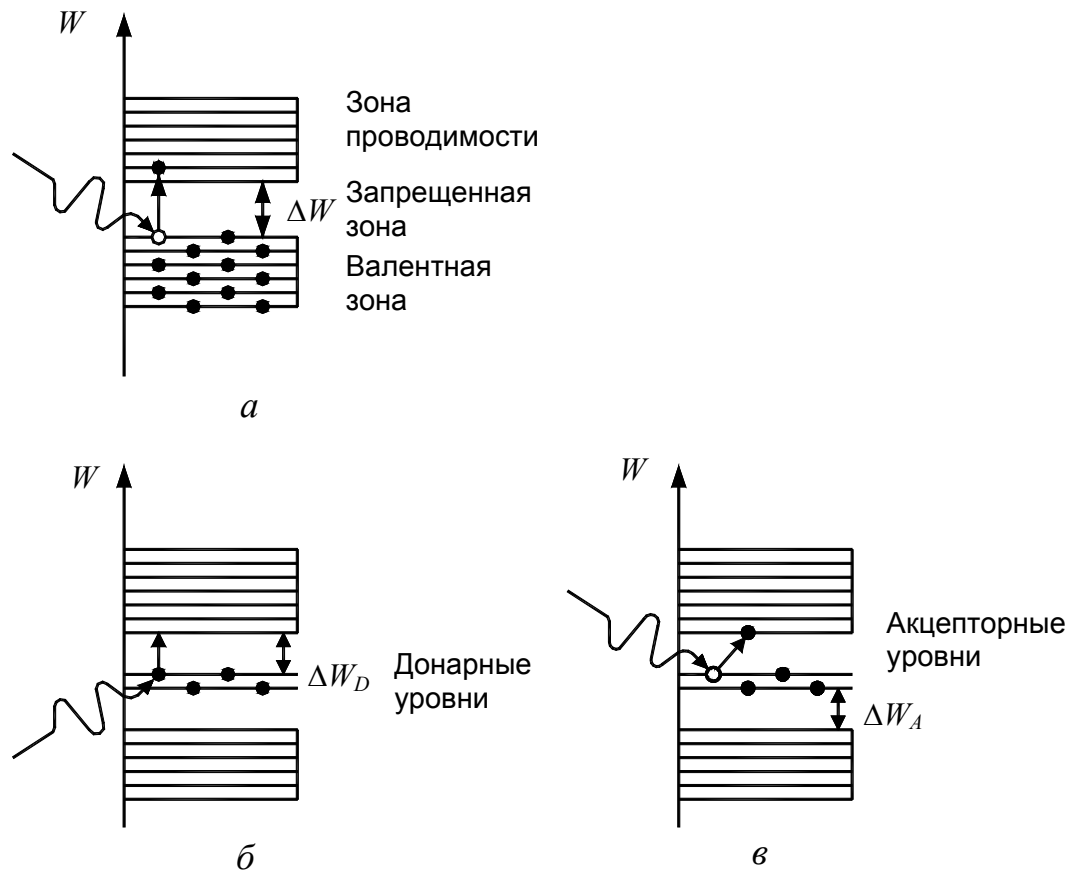


Рис. 3.7. Энергетические уровни в полупроводниках и фотопроводимость:  
● – электроны; ○ – дырки

Для каждого вещества она имеет свое значение, определяемое шириной запрещенной зоны:

$$h\nu_0 = \Delta W, \quad \nu = \frac{\Delta W}{h}.$$

В примесных полупроводниках фотопроводимость может возникать при поглощении фотонов с энергией, меньшей ширины запрещенной зоны. Это связано с тем, что в примесном полупроводнике в запрещенной зоне имеются дополнительные уровни энергии. В полупроводнике *n*-типа примесные (донорные) уровни расположены вблизи «дна» зоны проводимости на расстоянии  $\Delta W_D$  и заняты электронами (рис. 3.7, б). Электроны с донорных уровней могут перейти в зону проводимости при поглощении фотонов с энергией, а до тех пор электроны находятся в энергетических ловушках. Поэтому энергия электронного возбуждения в полупроводниках является законсервированной, а полупроводник выступает в роли аккумулятора свободной энергии.

Независимое перемещение электронов и дырок по своим зонам приводит не только к увеличению фотопроводимости, но и к миграции энергии, которая связана с тем или иным электроном (дыркой).

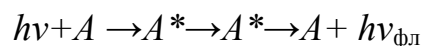
Высокая скорость экситонного переноса позволяет энергии электронного возбуждения мигрировать и тогда, когда молекулы не обладают способностью к флуоресценции. Экситонная миграция энергии возможна как между синглетными возбужденными, так и между триплетными уровнями. Например, между молекулами хлорофилла (бактериохлорофилла) в пигмент-белковых комплексах антенны.

Отличительной чертой полупроводниковой, зонной миграции энергии является то, что перенос связан с транслокацией не только энергии, но и зарядов, что делает возможным пространственное разделение первичного окислителя (дырка) и первичного восстановителя (электрон), а также длительное запасание энергии в ловушках.

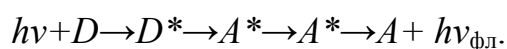
### 3.5. Физические методы изучения переноса энергии

К методам обнаружения процесса миграции энергии относятся:

- 1) измерение при различных длинах волн:
  - спектров действия (возбуждения): появление в спектре действия акцептора  $A$  полос поглощения донора  $D$  и, как следствие, фиксирование факта переноса энергии;
  - сопоставление квантовых выходов  $Q$  процесса при возбуждении в полосах поглощения  $A$  и  $D$ , что позволяет оценить эффективность миграции энергии ( $Q_A = Q_D - 100\%$  эффективность);
- 2) исследование поляризационных спектров люминесценции системы  $D+A$  и получение информации, например, о деполаризация флуоресценции  $A$  в вязких средах, где исключается релаксация молекулы за время жизни возбужденного состояния, а значит, осуществляется перенос энергии;
- 3) измерение кинетики затухания флуоресценции  $A$  при возбуждении ее в полосах поглощения  $A$  и  $D$ , так как перенос энергии  $D \rightarrow A^*$  требует известного времени: процесс



закончится раньше, чем процесс



Люминесцентный метод – один из эффективных инструментов для изучения механизмов переноса энергии. Последовательность процессов при реализации этого метода может быть представлена следующим образом:

1.  $D + h\nu_{Da} \rightarrow D^*$  – возбуждение донора.
2.  $D^* \rightarrow D + h\nu_{Df}$  – флуоресценция донора.
3.  $D^* + A \rightarrow D + A^*$  – перенос энергии.
4.  $A^* \rightarrow A + h\nu_{Af}$  – флуоресценция акцептора.

При возбуждении системы светом, соответствующим возбуждению донора, в случае частичного переноса энергии наблюдается флуоресценция как донора, так и акцептора. Если переноса энергии не будет, то в спектре будет только полоса люминесценции донора. При полном переносе энергии на акцептор в спектре будет только полоса люминесценции акцептора.

## ГЛАВА 4. ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

4.1. Механизмы трансформации энергии биохимических реакций в свет. Количественные характеристики хемилюминесценции. Генерация хемилюминесценции свободными радикалами

4.2. Хемилюминесценция при перекисном окислении липидов, природа перекисных свободных радикалов.

4.3. Использование хемилюминесцентных методов в биологии и медицине

### 4.1. Механизмы трансформации энергии биохимических реакций в свет. Количественные характеристики хемилюминесценции. Генерация хемилюминесценции свободными радикалами

Хемилюминесценция – свечение, возникающее за счет энергии химических реакций. Хемилюминесценция испускается продуктами реакций либо другими компонентами, акцептирующими энергию от продуктов. Процессы жизнедеятельности практически всегда сопровождаются очень слабым излучением, которое иногда называют сверхслабым свечением или собственным излучением клеток и тканей. В биохимических системах: в гомогенатах тканей, суспензиях клеток, суспензиях органелл, смесях ферментов и субстратов, собственная хемилюминесценция в большинстве случаев отличается крайне низкой интенсивностью. Некоторые организмы обладают способностью излучать довольно яркий свет, видимый простым глазом. Это явление известно с древних времен и получило название биолуминесценция, о ней речь пойдет в следующей главе.

**Молекулярный механизм хемилюминесценции.** В настоящее время известно довольно много химических реакций, сопровождающихся свечением. В большинстве случаев – это довольно сложные процессы со многими промежуточными стадиями.

В газах хемилюминесценция чаще всего наблюдается в экзотермических реакциях с участием свободных радикалов, например:



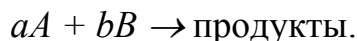
Примеры хемилюминесценции в растворах – перегруппировки изомеров производных бензола, разложения пероксидов. При этом должна заселяться разрыхляющая (возбужденная)  $\pi^*$ -орбиталь.

Интенсивность хемилюминесценции пропорциональна квантовому выходу хемилюминесценции и скорости химической реакции. *Квантовый*

выход хемилюминесценции – число испущенных квантов на один акт реакции. Скорость химической реакции  $v$  при малых концентрациях исходных веществ (как и в случае обычной, нелюминесцентной, реакции) определяется законом действия масс, т. е. пропорциональна концентрациям реагирующих веществ ( $C$ ) в степенях их стехиометрических коэффициентов:

$$v = k C^a C^b$$

для реакции между веществами  $A$  и  $B$ , записанной в общем виде:



Здесь  $k$  – константа скорости реакции, зависящая от условий проведения процесса (температура, катализатор и т. д.).

На [рис. 4.1](#) изображена схема движения системы по координате реакции в хемилюминесцентном процессе для экзотермической ( $\Delta H < 0$ ) и эндотермической ( $\Delta H > 0$ ) реакции.

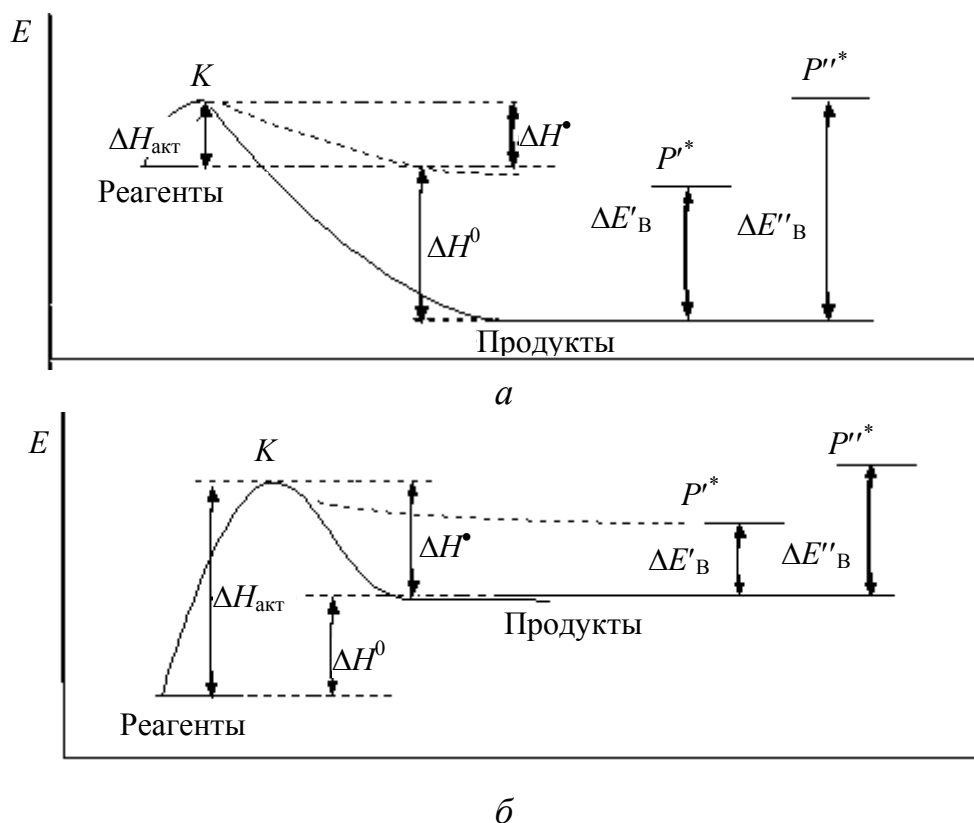


Рис. 4.1. Энергетический профиль экзотермической (а) и эндотермической (б) хемилюминесцентных реакции (в реакции образуется возбужденное состояние продукта  $P'$ , но не  $P''$ )

Образование возбужденных продуктов, не противоречащее закону сохранения энергии, возможно при выполнении условия энергетической достаточности  $\Delta H_{\text{акт}} - \Delta H \geq E_B$ , где  $\Delta H_{\text{акт}}$  – энтальпия активации;  $\Delta H$  – энтальпия реакции;  $E_B$  – энергия возбужденного состояния продукта реакции.

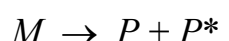
Для осуществления эндотермической хемилюминесцентной реакции ( $\Delta H > 0$ ) необходим подвод энергии извне.

Выделяют три главных этапа хемилюминесцентной реакции.

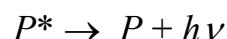
*Подготовительный этап* – химическое превращение исходных реагентов, ведущее к ключевой стадии: образование ключевого интермедиата реакции  $M$  – непосредственного предшественника возбужденного продукта:



*Ключевая стадия* – элементарный акт возбуждения. На этом этапе  $M$  превращается в следующий продукт реакции –  $P$ , часть которого образуется в возбужденном состоянии:



*Испускание кванта света*



и различные процессы безызлучательной дезактивации эмиттера хемилюминесценции  $P$ . Этот этап включает процессы, хорошо изученные в фотолюминесценции, и может быть назван «физическим этапом». Он характеризуется такими величинами, как время жизни эмиттера  $\tau_0$  и квантовый выход люминесценции эмиттера  $\Phi$  (отношение числа испущенных квантов к числу возбужденных молекул продукта реакции).

Образовавшаяся на 2-й стадии возбужденная молекула эмиттера не всегда дезактивируется испусканием кванта света. Квантовый выход люминесценции  $\Phi$  многих возбужденных продуктов бывает низким. Например, для фосфоресценции из триплетного  $n, \pi^*$ -состояния большинства карбонильных соединений  $\Phi$  не превышает  $10^{-4}$ – $10^{-5}$ . Поэтому для усиления интенсивности хемилюминесценции часто используют метод сенсibilизации свечения. Сущность этого метода заключается в использовании явления безызлучательного переноса энергии электронного возбуждения, хорошо изученного в фотолюминесценции. Энергия возбужденной в реакции частицы  $P^*$  (донора) передается введенному в раствор акцептору энергии  $A$  (активатору, вторичному эмиттеру). В качестве акцепторов выбирают хорошо люминесцирующие соединения, принадлежащие  $V$ -спектрально-люминесцент-ной группе ([табл. 2.2](#)).

В зависимости от того присутствуют или нет в реакционной смеси активаторы свечения, хемилюминесценция называется активированной или неактивированной. В иностранной литературе используются соответственно термины «непрямая» и «прямая» хемилюминесценция. Основное требование к активатору хемилюминесценции заключается в том, чтобы кинетика

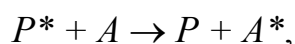


реакции была одинаковой в присутствии и отсутствии активатора, т. е. чтобы активатор принимал участие только в третьей стадии (физической) хемилюминесцентной реакции.

*Неактивированная (прямая) хемилюминесценция:*



*Активированная (непрямая) хемилюминесценция:*



Наибольший интерес представляет вторая стадия хемилюминесценции. Выявлены некоторые общие критерии для органических реакций, которые должны благоприятствовать возбуждению. *Первый из них* – критерий энергетической достаточности, являющийся условием, необходимым, но недостаточным для возбуждения. Это условие указывает на большую вероятность образования возбужденных продуктов именно в экзотермических реакциях, для которых характерны высокие отрицательные значения энтальпии активации ( $\Delta H$ ). Реагентами в таких реакциях служат вещества с высокой энтальпией образования, а продуктами, напротив, с низкой энтальпией, преимущественно устойчивые молекулы (разность этих энтальпий и равна  $\Delta H$ ).

Однако многие экзотермические реакции при выполнении первого критерия не являются хемилюминесцентными. *Второй критерий*, благоприятствующий возбуждению, – требование сближения поверхности потенциальной энергии реагентов реакции с поверхностью потенциальной энергии возбужденного состояния одного из продуктов реакции при движении по координате реакции. При этом возможен переход системы с поверхности основного состояния на возбужденную. Для простейшего случая столкновения двух атомов, при котором координата реакции представляет собой расстояние между атомами, а поверхность потенциальной энергии сводится к кривой потенциальной энергии, данный переход изображен на [рис. 4.1](#).

*Третий критерий* – структурное подобие или близость строения активированного комплекса (промежуточная структура в химической реакции, соответствующая точке *K* на [рис. 4.1](#)) и возбужденного состояния продукта реакции. Данный критерий хорошо выполняется для хемилюминесцентных реакций с переносом электрона, например, между катион- и анион-радикалами ароматических люминофоров. В этих реакциях вообще не разрываются и не образуются новые химические связи, т. е. перестройка ядерных конфигураций исключена.

## 4.2. Хемилюминесценция при перекисном окислении липидов, природа перекисных свободных радикалов

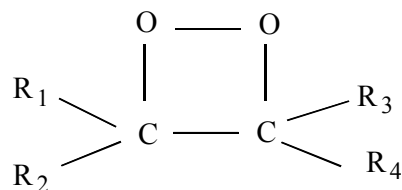
К настоящему времени для большинства хемилюминесцентных реакций окисления установлено, что ключевой стадией является распад промежуточных пероксидных соединений. Наиболее изученной реакцией является жидкофазное окисление углеводов кислородом, механизм которой изучен в работах Васильева.

Окисление предельных углеводов (алканов)  $RH$  идет по механизму цепной реакции и приводит к образованию гидропероксидных радикалов  $ROO$ , рекомбинация которых ведет к образованию промежуточного продукта – тетраоксида  $ROOOOR$ . Тетраоксид, распадаясь, приводит к образованию возбужденных карбонильных соединений (в ряде случаев нельзя исключать вероятность образования синглетного кислорода). На примере распада ряда тетраоксидов показано, что выход возбужденных триплетов на порядки превышает выходы возбужденных синглетов.

Таким образом, распад нециклических пероксидов обычно связывают с тетраоксидной хемилюминесценцией и гомолитическим разрывом связей.

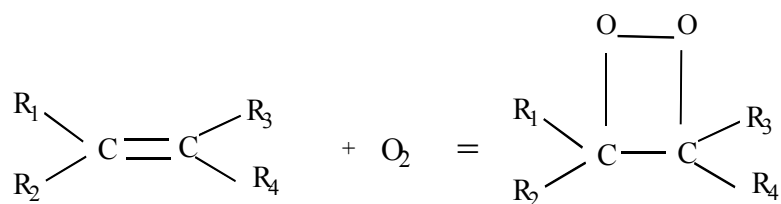
Образование электронно-возбужденных состояний в ряде случаев может осуществляться в результате переноса электрона между анион- и катион-радикалами. Перенос электрона происходит только при условии изоэнергетичности уровней электрона в анион-радикале и образующейся нейтральной возбужденной молекуле. При этом сольватная (или гидратная) «шуба» электрона понижает его энергию. Если нет изоэнергетичности, то избыток энергии должен перейти в энергию колебаний ядер (период колебаний  $10^{-3}$ – $10^{-12}$  с), «раскачать» которые за время переноса электрона ( $10^{-16}$  с) невозможно, поэтому переноса не произойдет. Вследствие изоэнергетичности электронных переходов может происходить акцептирование электрона как с возбужденного  $\pi^*$ -, так и с невозбужденного  $\pi$ -уровней. Соответственно электрон передается на свободную возбужденную  $\pi^*$ - или невозбужденную  $\pi$ -орбиталь образующейся нейтральной молекулы. Поэтому в реакции возможно образование возбужденных молекул как донора электрона, так и акцептора электрона.

Самое изученное химическое превращение, в котором возникают возбужденные молекулы, – разложение диоксетанов. К диоксетанам относятся пероксидные соединения, содержащие четырехчленный гетероцикл:



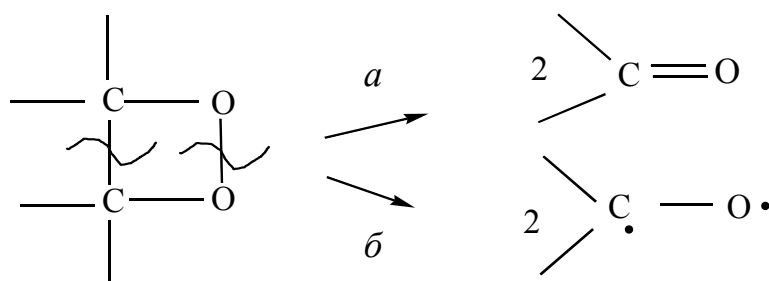
Диоксетаны могут образовываться в результате окисления непредельных органических соединений кислородом воздуха.

Схема 1



Распад диоксетанов приводит к образованию двух молекул кетона. Причем существует вероятность образования как невозбужденной (путь *a*, [схема 2](#)), так и возбужденной (путь *б*, [схема 2](#)) молекулы кетона с локализацией возбуждения на карбонильной группе (*n, π\**-возбуждение).

Схема 2



В случае *a* при гомолитическом разрыве O—O- и C—C-связей замыкается  $\pi$ -связь между углеродом и кислородом. Электрон занимает связывающую  $\pi$ -орбиталь молекулы и участвует в  $\pi$ -делокализации по ароматическим фрагментам, если для этой молекулы возможно такое сопряжение. В случае *б* при разрыве этих же связей один из электронов занимает несвязывающую *n*-орбиталь, а другой делокализуется по возбужденной (разрыхляющей)  $\pi^*$ -орбитали ароматического фрагмента молекулы. Образующаяся структура аналогична триплетной форме *n, π\**-состояния. По данным профессора Васильева, в ряде экспериментов по разложению диоксетанов выход триплетных состояний в 3 раза превышал выход синглетных состояний.

Возбуждению должна способствовать жесткость образующейся возбужденной молекулы, которая способствует перекрыванию орбиталей.

Будем считать, что при разложении диоксетана образуется ароматический кетон, принадлежащий классу  $\sigma\pi\pi$  ([табл. 2.2](#)). Если относительное положение уровней кетона соответствует I или II спектрально-люминесцентной группе, характеризующейся низшим *n, π\**-состоянием, то можно наблюдать либо слабую *n, π\**-флуоресценцию, либо при низких температурах *n, π\**-фосфоресценцию дополнительно. Если относительное положение уровней кетона соответствует III, IV или V спектрально-люминесцентной группе ([табл. 2](#)), характеризующейся ненизшим *n, π\**-состоянием, то за образованием *n, π\**-состояния (триплетного

или синглетного) следует сначала безызлучательная конверсия возбуждения в низшее триплетное состояние  $\pi, \pi^*$ -типа.

В ряде случаев активации хемилюминесценции молекулы активаторов не являются простыми акцепторами энергии возбуждения. Они образуют комплекс с переносом заряда с интермедиатом хемилюминесцентной реакции.

Мак-Капра предложил схему с образованием анион-катионной пары, аннигиляция которой приводит к образованию возбужденной молекулы активатора. На [схеме 3](#) этот процесс рассмотрен на примере дифеноилпероксида (ДП), как он был подробно исследован Шустером и Ку.

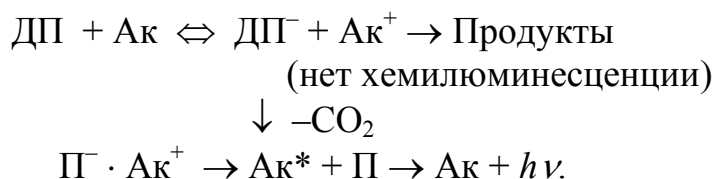
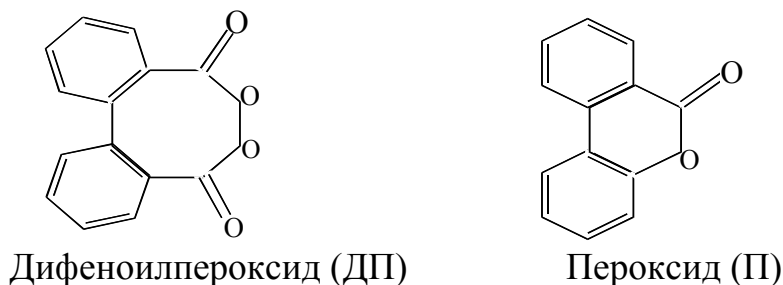


Схема 3



При встрече пероксида с активатором-донором электрона образуется ион-радикальная пара ([схема 3](#)). Электрон, который перешел от активатора на ближайшую по энергии вакантную разрыхляющую  $\sigma_{\text{O-O}}$ -орбиталь пероксида, ведет к образованию неустойчивого состояния анион-радикала, который легко распадается на  $\text{CO}_2$  и органический анион-радикал. Последний, являясь сильным донором электрона, возвращает электрон катион-радикалу активатора, не успевшему покинуть клетку растворителя. В этом сильно экзотермическом процессе обратного переноса электрона с большой вероятностью образуется возбужденное состояние.

Подобный тип возбуждения, когда ион-радикалы получают в растворе химическим путем, назвали «химически инициированной электронно-обменной люминесценцией» (ХИЭОЛ).

Свечение при реакциях цепного окисления липидов (в мембранных структурах клеток и липопротеинах крови) – эта реакция, идущая с участием свободных радикалов липидов  $\text{L}^\cdot$  и липопероксидов  $\text{LOO}^\cdot$ , которые как бы «ведут» цепи окисления:



Время от времени радикалы, ведущие цепь окисления, взаимодействуют друг с другом. В реакции взаимодействия двух радикалов липопероксида ( $\text{LOO}\cdot$ ) образуются молекулы кетона и кислорода в электронно-возбужденном состоянии, которые затем переходят в основное состояние, испуская квант света (фотон). Чем больше радикалов  $\text{LOO}\cdot$  в системе, т. е. чем энергичнее идут цепные реакции окисления липидов, тем выше интенсивность хемилюминесценции, сопровождающей реакцию радикалов. Антиоксиданты – вещества, реагирующие со свободными радикалами и тем самым тормозящие цепное окисление липидов, – одновременно подавляют хемилюминесценцию.

Одним из доказательств того, что хемилюминесценция связана с перекисным окислением липидов, является влияние ловушек свободных радикалов на интенсивность хемилюминесценции. Например, было доказано замедляющее действие антиоксиданта  $\alpha$ -токоферола на развитие хемилюминесценции в суспензии митохондрий в присутствии ионов двухвалентного железа. Опыты *in vitro* и *in vivo* указывают на то, что витамин Е оказывает ингибирующее действие и на хемилюминесцентную реакцию в микросомах.

Необходимым условием как развития хемилюминесценции, так и накопления продуктов перекисного окисления липидов в суспензиях митохондрий или в гомогенатах тканей является присутствие ионов негемового железа. Добавление этилендиаминтетраацетата натрия (ЭДТА) полностью ингибирует и накопление продуктов перекисного окисления, и хемилюминесцентную реакцию, в то время как добавление небольших количеств солей железа увеличивает и интенсивность хемилюминесценции, и образование продуктов окисления.

Хемилюминесценция в реакциях с участием окиси азота. Окись азота  $\text{NO}$  – это газ, хорошо растворимый в воде и обладающий высокой реакционной способностью; последнее связано с тем, что  $\text{NO}$  – свободный радикал. Открытие выделения окиси азота клетками человека и животных было сделано в 1984 году методом хемилюминесценции, правда, не в растворе, а в газовой фазе: при смешивании окиси азота и озона наблюдается яркая хемилюминесценция. Функции окиси азота весьма разнообразны: расслабление стенок кровеносных сосудов (вазодилатация), которое, в свою очередь, приводит к улучшению кровоснабжения органов, снижению общего

кровенного давления, окись азота выделяется клетками-фагоцитами и участвует в борьбе организма-хозяина с микроорганизмами, окись азота выделяется очень многими типами клеток и является одним из основных регуляторов внутриклеточных процессов. Фермент, катализирующий образование окиси азота в живых клетках, – NO-синтаза. Участие реакций нитроксида в собственной хемилюминесценции тканей животных было показано в опытах Джулио Терренса и сотрудников, которые изучали свечение перфузируемого легкого: свечение снижается очень существенно (на 85 %) при введении в перфузат нитро-L-аргинина, ингибитора NO-синтазы. При реакции окиси азота и супероксида образуется пероксинитрит (очень токсичен), реакция пероксинитрита с белком приводит к свечению, которое вносит существенный вклад в свечение всего органа.

Жизнедеятельность организмов всегда сопровождается слабой и сверхслабой хемилюминесценцией. Это объясняется тем, что процессы окисления органических соединений, которые являются химической основой дыхания живых систем, связаны с образованием электронно-возбужденных состояний (например, согласно [схеме 2](#), путь б). И в подавляющем большинстве случаев за образованием возбужденных состояний следует безызлучательная конверсия возбуждения по колебательным степеням свободы. Лишь в редких случаях – при биолуминесценции – выход свечения достаточно высок. Например, для светляков он приближается к 1.

### **4.3. Использование хемилюминесцентных методов в биологии и медицине**

Подавление собственной хемилюминесценции тканей и клеток такими антиоксидантами, как, например, токоферол (витамин Е), указывает на то, что это свечение обусловлено реакциями цепного окисления липидов. Изучая влияние различных природных и синтетических соединений на течение во времени (кинетику) хемилюминесценции, можно судить о способности этих веществ защищать наш организм от вредного действия свободных радикалов и тем самым отбирать кандидатов на определенные лекарства.

Природа процессов, определяющих собственное свечение тканей, может меняться при изменении состояния этой ткани. Например, у животных с воспалением легких ингибитор NO-синтазы слабо влиял на свечение органа, зато свечение снижалось антиоксидантами – супероксиддисмутазой и ловушками липидных радикалов. При воспалении на первый план выходят реакции, связанные с активацией клеток-фагоцитов и образованием ими активных форм кислорода, а затем – липидных перекисей, тогда как в норме за свечение ответственны реакции окиси азота.

Существует много областей, в которых успешно применяют измерение собственной хемилюминесценции, сопровождающей перекисное окисление липидов; вот некоторые из них:



- 1) изучение кинетики и механизма цепных реакций перекисного окисления липидов;
- 2) определение продуктов реакции цепного окисления – гидропероксидов в образце по вспышке хемилюминесценции при добавлении ионов  $\text{Fe}^{2+}$ ;
- 3) определение антиоксидантной активности химических веществ (лекарств) и биологических жидкостей (например плазмы крови);
- 4) клинические лабораторные исследования.



# ГЛАВА 5. БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

## П л а н г л а в ы

[5.1.Биолюминесцентные организмы.](#)

[5.2.Общий механизм биолюминесценции.](#)

[5.3.Биолюминесцентная реакция светляков.](#)

[5.3.1.Преобразование люциферина в ходе реакции.](#)

[5.3.2.Светляковая люцифераза.](#)

[5.3.3.Формирование спектрального состава биолюминесценции светляков.](#)

[5.4.Биолюминесценция кишечнорастворимых.](#)

[5.4.1.Фотопротеины.](#)

[5.4.2.Структура Са-связывающего участка фотопротеинов.](#)

[5.4.3.GFP – вторичный эмиттер биолюминесценции кишечнорастворимых.](#)

[5.5.Физико-химические механизмы биолюминесценции бактерий.](#)

[5.5.1.Общая характеристика биолюминесценции бактерий in vitro.](#)

[5.5.2.Образование эмиттера в биолюминесцентной реакции.](#)

[5.5.3.Флуоресцентные белки светящихся бактерий.](#)

[5.6.Малоизученные типы биолюминесцентных реакций.](#)

[5.6.1.Биолюминесценция динофлагеллят.](#)

[5.6.2.Свечение червей.](#)

[5.6.3.Биолюминесценция грибов.](#)

[5.7.Физико-химические основы биолюминесцентного анализа.](#)

[5.7.1.Применение светящихся бактерий.](#)

[5.7.2.Применение биолюминесцентных реакций.](#)

[5.7.3.Механизмы влияния химических соединений на интенсивность биолюминесценции in vitro.](#)

*Биолюминесценцией* называют свечение живых организмов. Оно осуществляется за счет специальных химических реакций, проходящих с выделением света (такие реакции называются *хемилюминесцентными*, знакомство с ними состоялось при изучении предыдущей главы данного пособия).



Биолюминесценция – явление не настолько редкое, как может показаться нам, жителям Восточной Сибири. Просто мы удалены от морей и океанов, где обитает подавляющее большинство светящихся организмов. И даже жуки-светляки в нашем климате не живут. А между тем в настоящее время известно *несколько сотен* биолюминесцентных видов. Светящиеся виды встречаются как среди одноклеточных организмов (бактерии, радиолярии и др.), так и среди многоклеточных (грибы, медузы, кальмары, рыбы, рачки, жуки, комары и др.). Не найдены биолюминесцентные организмы среди рептилий, высших растений и млекопитающих.

## 5.1. Биолюминесцентные организмы

Многоклеточные животные обычно излучают свет не всем телом, а только специальными клетками *фотоцитами*, часто сгруппированными в особые органы свечения – *фотофоры*. Иногда фотофоры светятся непрерывно благодаря обитающим в них симбиотическим фотобактериям. Но обычно свечение происходит в виде коротких вспышек и контролируется нервной системой. Биолюминесценция бывает *внутриклеточная* или *секреторного типа*. В последнем случае компоненты биолюминесцентной реакции «выбрасываются» из организма в виде покрывающей его слизи или расплываются вокруг него в воде, как большое световое облако.

В настоящее время известно более 800 видов светящихся организмов, из них простейших около 50, кишечнорастворимых примерно 100, моллюсков более 200 и рыб около 300 видов. Многообразие светящихся организмов и выполняемых биолюминесценцией функций отражено в [табл. 5.1](#).

Следует отметить, что многие светящиеся организмы еще недостаточно изучены – не известны компоненты биолюминесцентных реакций, не изучены функции свечения. Список биолюминесцентных видов постоянно пополняется вновь открытыми участниками.

## 5.2. Общий механизм биолюминесценции

Как и всякая люминесценция, биолюминесценция наблюдается вследствие дезактивации возбужденных молекул – *эмиттеров*. Эти эмиттеры возникают в организмах в ходе специальных биохимических реакций.

Таблица 5.1

Биолюминесцентные организмы

Таксон	Роды	Особенности свечения (максимум излучения)	Функции свечения
Бактерии	<i>Photobacterium</i> <i>Vibrio</i> <i>Xenorhabdus</i>	Стабильное яркое свечение (475–540 нм)	Симбиоз, паразитизм
Грибы	<i>Panus</i> , <i>Armillaria</i> , <i>Pleurotus</i>	Стабильное тусклое свечение (533 нм)	Для привлечения насекомых
Динофлагелляты (жгутиконосные водоросли)	<i>Gonyaulax</i> , <i>Pyrocystis</i> , <i>Noctiluca</i>	В ответ на раздражение возникают короткие яркие вспышки (470 нм)	Средство отпугивания или дезориентации хищников
Стрекающие кишечнорастворимые: медузы, гидроиды, морские перья	<i>Aequorea</i> , <i>Obellia</i> , <i>Renilla</i>	Яркая вспышка или серия вспышек (460–510 нм)	Средство отпугивания или устрашения
Нестрекающие: гребневки	<i>Mnemiopsis</i> , <i>Beroe</i>	Яркие вспышки (460 нм)	Средство отпугивания или устрашения
Кольчатые черви: земляные, многощетинковые, одонтосилис, ахолоэ	<i>Diplocardia</i> , <i>Chaetopterus</i> , <i>Odontosyllis</i> , <i>Achloe</i>	Клеточные выделения или внутриклеточные вспышки, временами очень яркие (465–530 нм)	Средство отпугивания или устрашения, ухаживание
Моллюски: двусторчатые, головоногие (кальмары)	<i>Latia</i> , <i>Pholas</i> , <i>Heteroteuthis</i>	Свечение секреторного типа, фотофоры с симбиотическими бактериями у некоторых кальмаров (490 нм)	Отвлечение, приманка, маскировка
Ракообразные: ракушковые, рачки, креветка, веслоногие	<i>Vargula</i> , <i>Cypridina</i> , <i>Meganocyttiphanes</i> , <i>Gaussia</i>	Выделение (выброс) светящегося облака (465–470 нм)	Отвлечение, приманка, ухаживание, маскировка, устрашение хищника
Насекомые: Жесткокрылые (жуки), светляки, жуки-щелкуны, железнодорожный червь	<i>Photinus</i> , <i>Photirus</i> , <i>Pyrophorus</i> , <i>Arachnocampa</i>	Импульсы видово-специфичной формы (480–580 нм)	Устрашение хищника, ухаживание, приманка для привлечения жертвы
Иглокожие (офиуры)	<i>Phiopsila</i>	Серия быстрых вспышек	Устрашение, отпугивание
Хордовые (оболочники)	<i>Pyrosoma</i>	Серии ярких вспышек, стимулируются механически, светом и другими факторами (480–500 нм)	Функция неизвестна
Рыбы: хрящевые, костные (сребробрюшковые, рогатые удильщики, рыба-меч, морские среднеглубинные)	<i>Isistius</i> , <i>Leiognathus</i> , <i>Photoblepharon</i> , <i>Cryptopsaras</i> , <i>Porichthys</i> , <i>Cyclothone</i> , <i>Neoscopelus</i> , <i>Tarletonbeania</i>	Вентральное маскирующее свечение, фотофоры латерально и на языке (490 нм)	Привлечение и захват жертвы, ухаживание, устрашение хищников, внутривидовая коммуникация

Биолюминесцентные реакции представляют собой, как правило, окисление некоторого вещества, называемого люциферином, кислородом воздуха, катализируемое специальным ферментом люциферазой (названия образованы от латинского *luciferos* – «несущий свет»). Во время такого ферментативного окисления люциферина выделяется большое количество энергии (40–80 ккал/моль), переводящее промежуточный продукт этой реакции в возбужденное состояние (рис. 5.1).

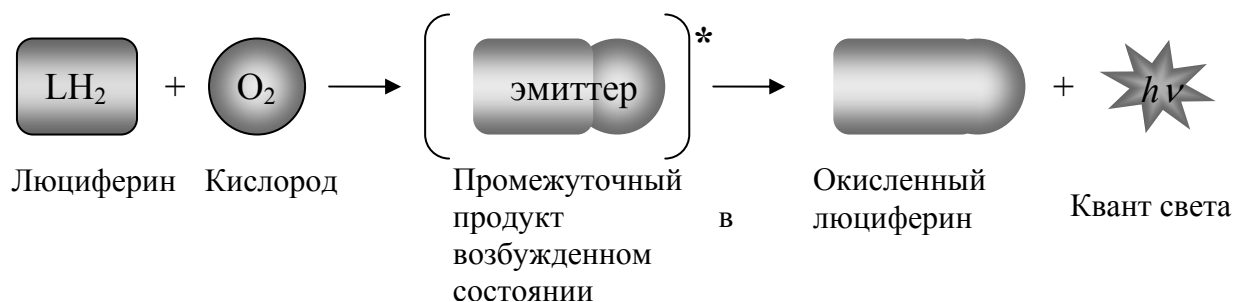


Рис. 5.1. Упрощенная схема биолюминесцентной реакции в активном центре люциферазы

Названия люцифераза и люциферин – условные. У разных светящихся организмов эти ферменты и субстраты не схожи по своему химическому строению (рис. 5.2, прил. 5). В настоящее время известно около 30 типов люцифераз и соответствующих им люциферин

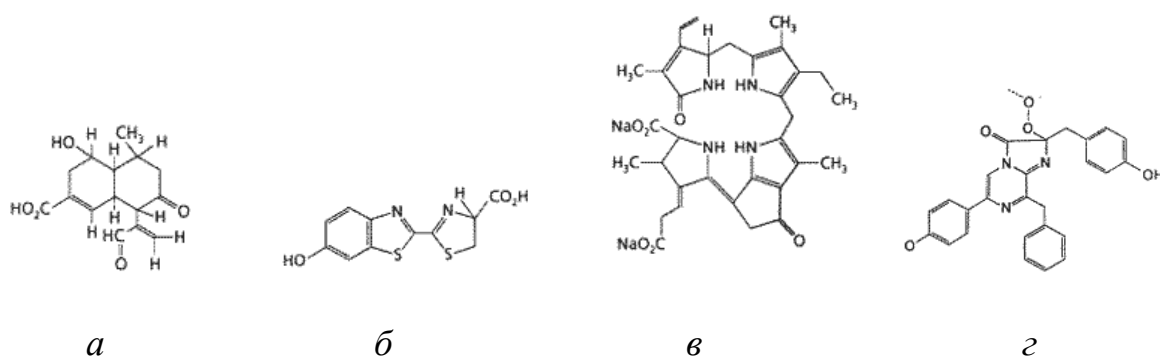


Рис. 5.2. Люциферины разных светящихся организмов:  
а – агариковых грибов; б – жуков-светляков; в – динофлагеллят;  
г – кишечнорастворимых, радиолярий, гребневиков и др.

Многим биолюминесцентным реакциям для излучения света помимо основных компонентов требуется еще дополнительный низкомолекулярный «участник». Например, для эффективного протекания биолюминесцентной реакции светлячков требуются ионы магния.

Химически разные биолюминесцентные реакции объединяет несколько характерных черт.

1. Всем этим реакциям абсолютно необходим молекулярный кислород.

2. Люциферины, как правило, представляют собой хорошо флуоресцирующие соединения. Все они характеризуются сходными спектрально-люминесцентными свойствами.

3. В подавляющем большинстве случаев обязательным участником реакции является специфический белковый компонент – фермент люцифераза. Считается, что именно благодаря этому компоненту биолюминесцентные реакции излучают яркий свет: белок прикрепляет к себе реагирующие вещества и образовавшиеся возбужденные эмиттеры и защищает их от вмешательства «посторонних» молекул, способных помешать акту излучения кванта света.

4. Излучение биолюминесценции происходит с возбужденного промежуточного фермент-субстратного комплекса (эмиттера).

Весь цикл преобразований в ходе биолюминесцентной реакции условно разбивается на четыре стадии.

I. Образование промежуточных фермент-субстратных комплексов (интермедиатов).

II. Элементарный акт возбуждения и переход некоего интермедиата в эмиттер.

III. Испускание кванта света.

IV. Релаксация люциферазы в исходное состояние.

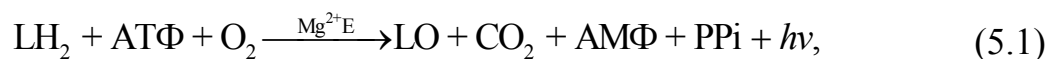
Эффективность биолюминесцентных реакций характеризуется величиной, называемой квантовым выходом биолюминесценции. Эта характеристика определяется как отношение числа прореагировавших молекул к числу излученных квантов. Квантовый выход люциферазных реакций высок (0,1–1). Это связано с образованием промежуточных продуктов в форме фермент-субстратных комплексов, защищающих эмиттер от процессов переноса и превращения энергии, конкурирующих с испусканием света. При этом белок может играть роль матрицы, обеспечивающей жесткую фиксацию флуорофора, что также немаловажно для эффективной флуоресценции.

Спектральный состав люминесценции живого организма (биолюминесценция *in vivo*) может сильно отличаться от излучения биохимической реакции, лежащей в основе (биолюминесценция *in vitro*). В одних случаях причиной такого различия являются биологические фильтры и влияние окружения активного центра фермента. В других случаях сдвиг спектра происходит из-за переноса энергии возбуждения на молекулу вторичного эмиттера. Кроме того, различается спектральный состав люминесценции морских и наземных организмов. В первом случае спектры располагаются преимущественно в сине-зеленой области видимого диапазона. Во втором – почти весь видимый диапазон (табл. 5.1). Это объясняют, в частности, повышенной спектральной чувствительностью глаза рыб к сине-зеленому цвету.

### 5.3. Биolumинесцентная реакция светляков

Различные виды светляков (насекомые семейства *Lampyridae*) встречаются на юге Северной Америки, в Японии, Юго-Восточной Азии, а также на Черноморском побережье Кавказа и в Приморском крае.

Люциферазы разных видов светляков немного отличаются по строению и составу аминокислот, максимуму длины волны излучаемого света (554–582 нм) и другим параметрам. Но, не смотря на это, все они катализируют один и тот же химический процесс – реакцию окисления кислородом воздуха люциферина ( $\text{LH}_2$ ) в присутствии аденозин-5'-трифосфата (АТФ) и ионов  $\text{Mg}^{2+}$ . Суммарное уравнение этого процесса выглядит так:



где Е – люцифераза, LO – оксилюциферин,  $\text{CO}_2$  – углекислый газ, АМФ – аденозин-5'-монофосфат, PPi – пирогосфат,  $h\nu$  – квант света.

#### 5.3.1. Преобразование люциферина в ходе реакции.

Последовательные превращения люциферина в процессе биolumинесцентного окисления представлены на [рис. 5.3](#). Первоначально происходит образование люцифериладенилата ([рис. 5.3](#), соединение II) и пирогосфата при взаимодействии  $\text{LH}_2$  ([рис. 5.3](#), I) с  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ. Люцифериладенилат окисляется молекулярным кислородом с образованием промежуточного циклического пероксида – диокситанона ([рис. 5.3](#), III) – и молекулы АМФ. Образующийся в ходе окисления циклический пероксид-диокситанон – распадается с выделением углекислого газа и возникает анион-бирадикал оксилюциферина ([рис. 5.3](#), IV). По-видимому, эта энергетически богатая заряженная структура моментально отщепляется от гидрофобного участка связывания. Затем происходит внутримолекулярная аннигиляция (перегруппировка) радикалов с образованием синглетного электронно-возбужденного состояния оксилюциферина ([рис. 5.3](#), V). Активная частица LO мгновенно излучательно дезактивируется (переходит в основное состояние VI, [рис. 5.3](#)), что сопровождается испусканием видимого света в водном окружении, и вновь связывается в комплексе с белком.



Таким образом, эмиттером в биолюминесцентной реакции светляков является оксильюциферин (рис. 5.3, V) в синглетном электронно-возбужденном состоянии.

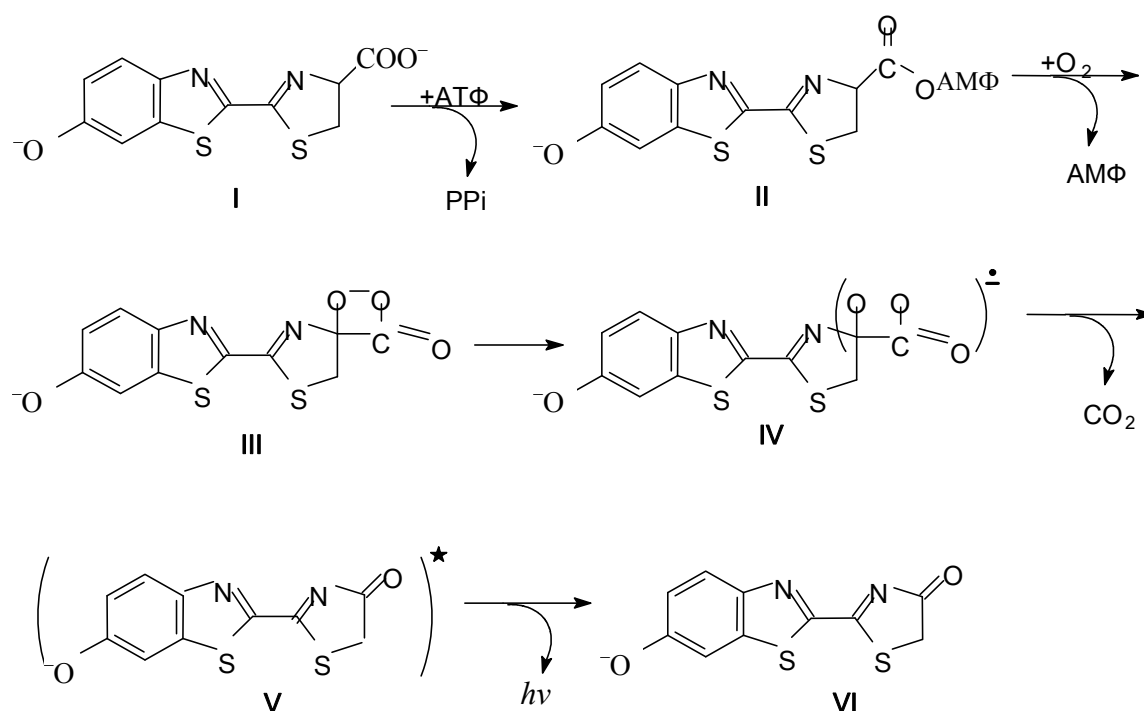


Рис. 5.3. Механизм биолюминесцентной реакции, катализируемой люциферазой светляков

Хочется обратить внимание на так называемый диссоциативный механизм поведения эмиттера в биолюминесцентной системе светляков. Подробное сравнение рН-зависимости спектров оксильюциферина в разных средах со спектрами биолюминесценции показало, что наилучшей средой, моделирующей поведение эмиттера в нативной люциферазной системе, является водный раствор. Кроме того, было выяснено, что комплекс люцифераза – оксильюциферин настолько прочен, что его легко выделить из реакционной среды с помощью хроматографии. Однако при этом не наблюдается никаких различий в степени поляризации света, испускаемого оксильюциферинном в свободном состоянии и в комплексе с люциферазой. Это может быть связано с высокой подвижностью и свободным вращением возбужденного оксильюциферина в составе комплекса с белком. Зависимость стационарных спектров флуоресценции от рН среды и кинетика затухания процесса при импульсном режиме возбуждения указывают на то, что свойства микроокружения электронно-возбужденного оксильюциферина, когда он находится в комплексе с люциферазой, близки к свойствам растворителя с высокой диэлектрической проницаемостью, например воды. Это противоречит другим экспериментальным фактам, которые свидетельствуют, что участок белка, связывающий оксильюциферин, гидрофобен, а не гидрофилен, как вода. Для объяснения этих противоречий и



была предложена гипотеза «диссоциативного» механизма излучения. Предполагают, что возбужденный оксильюциферин на некоторое время отсоединяется от люциферазы, и излучение кванта света происходит в околобелковом пространстве в окружении молекул воды, структурированных аминокислотными остатками. Затем оксильюциферин, будучи уже в основном состоянии, вновь связывается с люциферазой, образуя прочный комплекс.

### 5.3.2. Светляковая люцифераза.

Люцифераза светляков состоит из двух субъединиц с молекулярной массой 50000 каждая и не содержит простетических групп. В состав молекулы люциферазы входит большое количество гидрофобных аминокислот, что объясняет высокую склонность люциферазы к образованию агрегатов, особенно при низких значениях ионной силы. Люцифераза светляков содержит, по крайней мере, одну SH-группу, существенную для проявления активности, и имеет высокую специфичность к своим субстратам: люциферину и АТФ. Уровень свечения с аналогами АТФ обычно в 50–100 раз ниже по сравнению с АТФ; при этом во многих случаях происходит изменение положения максимума излучения.

Сравнение аминокислотных последовательностей люцифераз светляков и жуков показывает, что все эти ферменты имеют сходный аминокислотный состав. Более половины аминокислотных остатков люцифераз – неполярные и амбивалентные. Общее число заряженных остатков практически одинаково для всех люцифераз. Основное отличие состоит в числе остатков цистеина (Cys) и триптофана (Trp). Люцифераза *P. pyralis* имеет четыре остатка Cys, люциферазы светляков рода *Luciola* – 7–8 остатков Cys, а люциферазы жуков – по 13 остатков Cys. Люциферазы светляков рода *Luciola* содержат по одному остатку Trp (для *Luciola mingrelica* это Trp 419), а другие по 2–3 остатка Trp (для *Photinus pyralis* это Trp 417 и Trp 426). Один из триптофановых остатков является консервативным во всем семействе люцифераз: Trp 419 *Luciola mingrelica* и Trp 417 *Photinus pyralis*.

Люциферазы светляков и жуков имеют довольно высокую гомологию в аминокислотной последовательности. Для люцифераз светляков рода *Luciola* гомология составляет 80%. Люцифераза светляков *Luciola mingrelica* гомологична на 43% с люциферазой жуков и на 67% с люциферазой светляков *Photinus pyralis*.

Кристаллическая структура люциферазы *Photinus pyralis* ([прил. 5](#)) получена без субстратов, поэтому локализация и структура активного центра не ясна. Поскольку процесс биолюминесцентного окисления люциферина включает стадию образования люцифериладенилата ([рис. 5.3](#), II), сравнение аминокислотных последовательностей различных ферментов, катализирующих образование аденилата, позволяет выявить консервативные участки, которые, возможно, находятся в активном центре фермента. Аминокислотные остатки, инвариантные в люциферазах и других аденилатобразующих ферментах, находятся на поверхности двух доменов, и

их разделяет широкая щель. Возможно, что именно в этой междоменной щели находится активный центр люцифераз. Однако эти поверхности, образованные консервативными аминокислотными остатками, слишком удалены друг от друга, чтобы одновременно взаимодействовать с субстратами. Поэтому предполагается, что в процессе реакции домены сближаются, захватывая субстраты с двух сторон.

### 5.3.3. Формирование спектрального состава биолюминесценции светляков.

Максимумы биолюминесценции разных видов светляков лежат в интервале от 540 до 590 нм. Так, например, люциферазы из *Luciola mingrelica* и *Luciola cruciata* имеют максимум биолюминесценции, лежащий в интервале от 562 до 570 нм, в то время как максимум биолюминесценции для *Luciola lateralis* равен 552 нм. Спектры биолюминесценции для люцифераз из различных источников, снятые в одинаковых условиях, имеют одинаковую форму, а отличаются лишь по положению максимума. Многие светляковые люциферазы демонстрируют зависимость спектра биолюминесценции от pH среды ([рис. 5.4](#)).

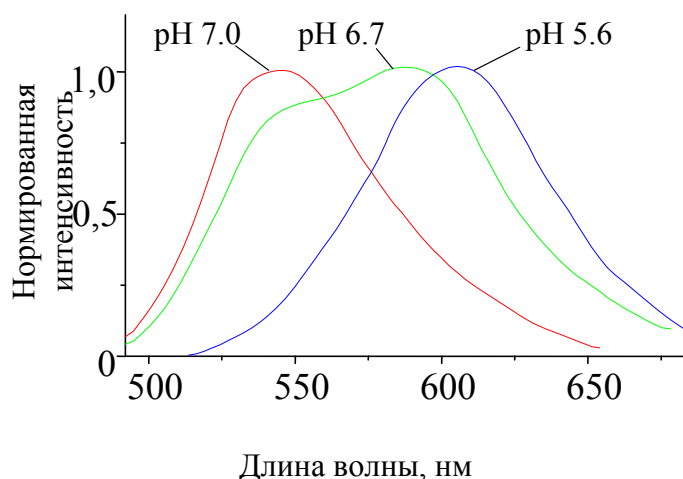


Рис. 5.4. Спектры излучения биолюминесцентной реакции светляков *L. mingrelica* при различных значениях pH

До сих пор в литературе не существует единого мнения о механизме формирования цвета биолюминесценции светляков. Выдвинуто три основные гипотезы на это счет.

1. Цвет биолюминесценции обусловлен конформационными изменениями оксилюциферина.

Рентгено-структурный анализ и квантово-механические расчеты молекулы LO, находящейся в синглетном электронно-возбужденном

состоянии, показали, что возможно свободное вращение молекулы вокруг связи C2–C2' ([рис. 5.5](#)).

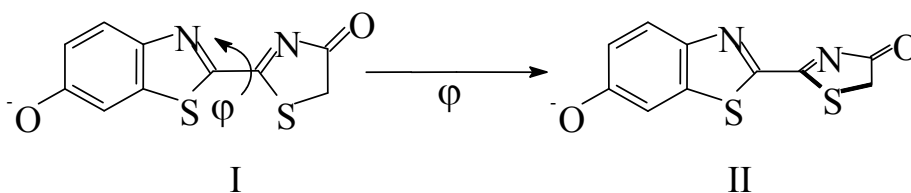


Рис. 5.5. Конформационные изменения молекулы LO,  
находящейся в возбужденном состоянии\*

Если угол  $\phi$  равен  $90^\circ$  ([рис. 5.5](#), II), энергия такой структуры минимальна и цвет люминесценции красный. Стереометрические затруднения в активном центре обычного фермента приводят к невозможности вращения молекулы по C2–C2' связи, т. е. к плоской структуре I ([рис. 5.5](#)), которая излучает желто-зеленый цвет. При уменьшении пространственных ограничений – частичная денатурация при нагревании, действие кислот и т. д. – реализуется более энергетически выгодное состояние II ([рис. 5.5](#)) и максимум биолюминесценции сдвигается в длинноволновую область. Другими словами, структура активного центра фермента влияет на угол вращения  $\phi$  в молекуле LO. В зависимости от величины этого угла цвет биолюминесценции меняется от желто-зеленого до красного.

2. Спектральные отличия биолюминесцентных реакций объясняются структурными особенностями люцифераз.

В основе этой гипотезы лежит предположение о том, что структура излучателя во всех биолюминесцентных системах одинакова, а различия в цвете биолюминесценции *in vivo* можно объяснить отличиями в структуре фермента. В доказательство этого предположения приводятся многочисленные данные по сдвигу спектров биолюминесценции мутантными формами люцифераз. Например, было показано, что изменение цвета биолюминесценции может быть обусловлено единичными заменами аминокислот *Val-239* → *Ile*, *Pro-452* → *Ser*, *Ser-286* → *Asn* и *His-433* → *Tyr*. Такие замены приводят к сдвигу максимума биолюминесценции в зеленую (558 нм), желто-оранжевую (595 нм), оранжевую (607 нм) и красную ( $\lambda_{\text{max}} = 609$  и 612 нм) области спектра соответственно.

3. Сдвиги спектров биолюминесценции связаны с переходами между фенолятными формами LO в активном центре фермента.

Исследование pH-зависимости спектров флуоресценции водных растворов LO показало, что это соединение в растворе может присутствовать

\* McCapra F., Gilfoyle D. J., Young D. Y., Church N. J., Spencer P., The chemical origin of colour differences in beetle bioluminescence, *Bioluminescence and Chemiluminescence: Fundamentals and Applied Aspects* (Edited by Campbell A. K., Kricka L. J., Stanley P. E.), Chichester NY: John Wiley & Sons, 1994, p. 387–391)

в шести различных формах (рис. 5.6), флуоресцирующих с разными спектральными максимумами.

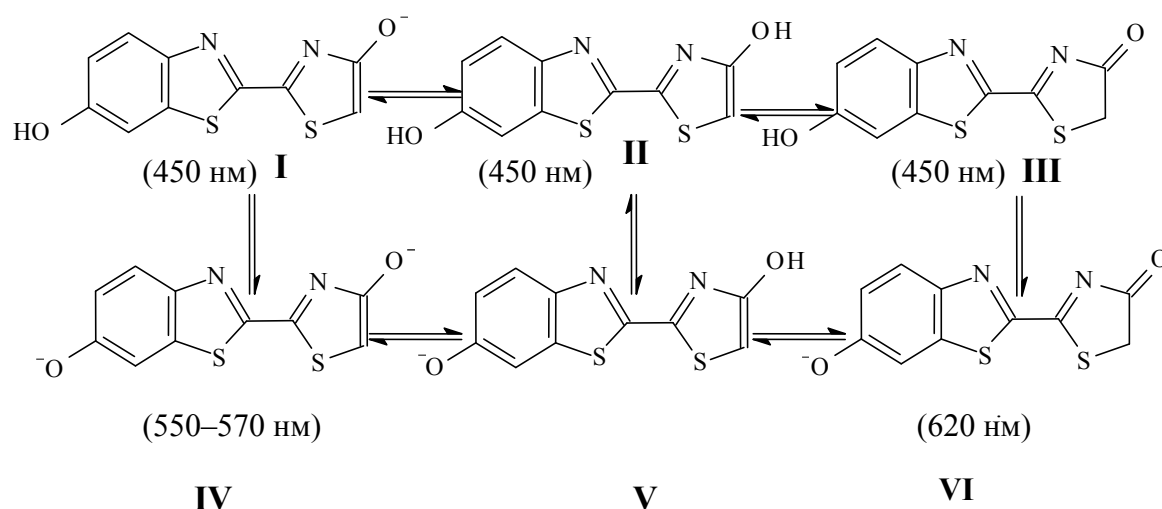


Рис. 5.6. Фенольные (I, II, III), фенолятные (IV, V, VI), енольные (I, IV) и кетонные (III, VI) формы оксилуциферина (в скобках приведены максимумы спектров фотолюминесценции)\*

На основании этих результатов было высказано предположение, что причиной изменения цвета биолюминесценции в зависимости от pH (рис. 5.4) являются *специфические* взаимодействия белка с эмиттером, приводящие к существованию равновесия фенолятных форм LO в активном центре фермента (рис. 5.6, IV–VI). Результирующий спектр является суперпозицией спектров, соответствующих разным формам.

Таким образом, с изменением pH должно наблюдаться изменение формы спектра, что и происходит для ферментов из одного источника. Однако для ферментов из различных источников при фиксированном значении pH наблюдается лишь изменение положения максимума биолюминесценции, но не изменение формы спектра, т. е. в каждом случае излучающей частицей является единственная форма LO. В этом случае наблюдаемое изменение положения максимума биолюминесценции для различных люцифераз объясняют существованием *неспецифических* взаимодействий излучателя с белковой глобулой, согласно теории флуоресцентной спектроскопии. Причиной изменения цвета биолюминесценции для различных люцифераз называется параметр

\* Источник: Gandelman O. A., Brovko L. Yu., Ugarova N. N., Chikishev A. Yu., Shkurinov A. P., Oxyluciferin fluorescence is a model of native bioluminescence in the firefly luciferin – luciferase system, J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 1993, v. 19, p. 187–191.

поляризуемости или скорость переориентации микроокружения относительно возбужденной молекулы эмиттера.

## 5.4. Биолюминесценция кишечнополостных

### 5.4.1. Фотопротеины.

Биолюминесценция среди кишечнополостных (*Coelenterata*) распространена довольно широко. Известно несколько десятков видов гидромедуз, излучающих свет в ответ на раздражение. В группе сцифомедуз достоверно известны четыре светящихся рода. Наиболее распространена в океане *Pelagia nocticula*, диаметр колокола которой достигает 25 см, а протяженность щупалец – 2 м. Свечение кишечнополостных внутриклеточное.

Биолюминесценция многих видов морских кишечнополостных обусловлена специфическими белками, представляющими собой устойчивый комплекс люциферазы с люциферинном. Эти белки называют  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемыми (или кальций-зависимыми) *фотопротеинами*. Фотопротеины состоят из небольшого (20–30 кДа) одноцепочного полипептида-апопротеина, люциферина и молекулы кислорода. Люциферинном кишечнополостных является целентеразин – гетероциклическое соединение с довольно сложной структурой, производное имидазолпиразина (рис. 5.7, структура I). Целентеразин окисляется молекулярным кислородом до состояния гидроперекиси при присоединении к апопротеину (рис. 5.7, структура II). Биолюминесценция такой системы возникает при появлении ионов кальция, изменяющих конформацию белка так, что он утрачивает связь с перекисью люциферина. Перекись при этом теряет стабильность и превращается в окисел, попутно отделяя  $\text{CO}_2$  и испуская синий свет (рис. 5.7). Фотопротеины в отличие от люцифераз способны совершать только один каталитический акт: при взаимодействии с ионами кальция вся аккумулированная в комплексе энергия излучается в виде квантов света.

Следует заметить, что целентеразин выполняет функцию люциферина не только у кишечнополостных, но также у радиолярий, гребневиков, щетинкочелюстных червей, некоторых рыб и кальмаров, креветок и, наконец, веслоногих и ракушковых планктонных рачков.

В настоящее время известно около 25 видов люминесцирующих морских кишечнополостных (включая семейства *Cnidaria* и *Ctenophora*), обладающих фотопротеиновым типом люминесцентной системы. Однако только 7 из известных фотопротеинов выделены и частично охарактеризованы.

Наиболее изучены *обелин* из гидроидных полипов рода *Obelia* и *акворин* из гидромедуз рода *Aequorea*. Трехмерная структура этих фотопротеинов приведена в прил. 5, спектры биолюминесценции – на

рис. 5.8. Обелин – мономерный белок с молекулярной массой 30000. Для обелина характерен спектр люминесценции с максимумом при 469 нм, что находится в хорошем соответствии со спектральными характеристиками биолюминесценции *in vitro*. Оптимум pH люминесценции обелина приходится на интервал 9,0–10,5. По основным физико-химическим свойствам обелин сходен с акворин.

Для люминесценции морских перьев *Renilla* характерна стадия предварительной активации люциферина. На этой стадии неактивный люциферилсульфат взаимодействует с 3,5-дифосфоаденозином (PAP) в присутствии люциферилсульфокиназы и переходит в активный люциферин, который окисляется люциферазой с образованием кванта света, оксильюциферина и CO<sub>2</sub>. Механизмы образования возбужденного комплекса фотопротейна у *Renilla* сходны с аналогичными процессами у *Aequorea* и *Obelia*. Однако полученный в ходе реакции фотопротейн последних отличается высокой стабильностью и способен в течение долгого времени находиться в возбужденном состоянии, не диссипируя энергию до тех пор, пока в системе не появятся двухвалентные металлы (Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>).

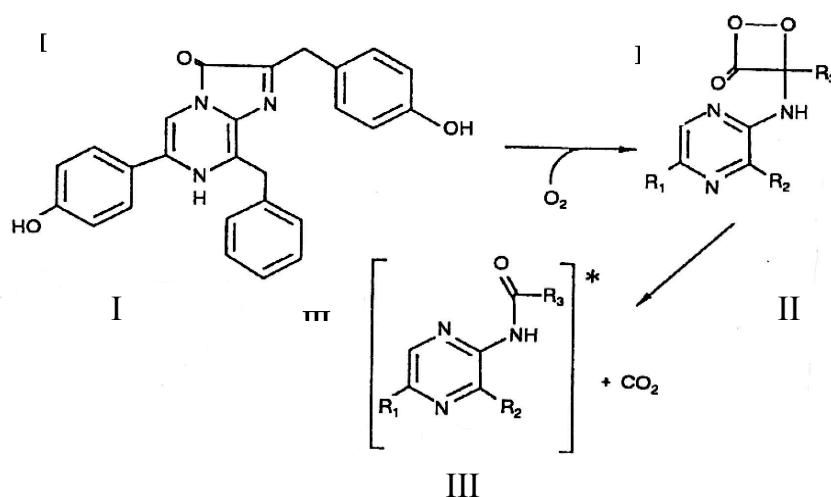


Рис. 5.7. Превращения целентерина  
в ходе биолюминесцентной реакции кишечнорастворимых

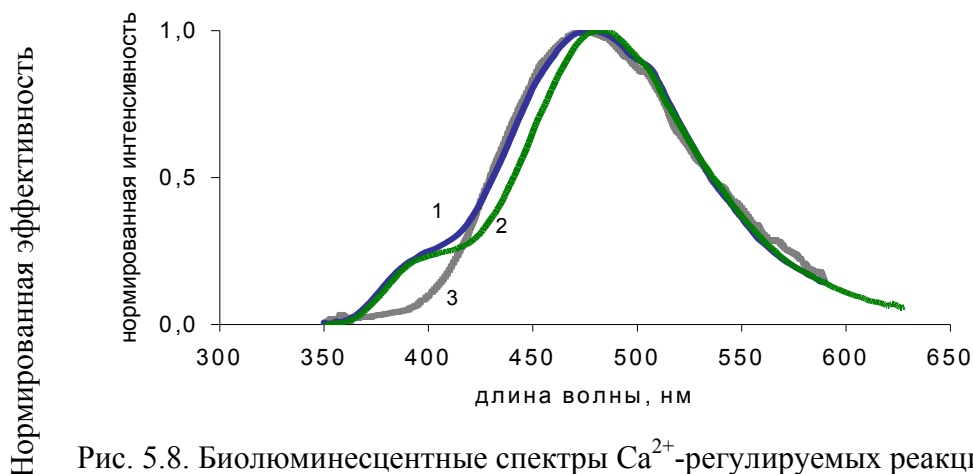


Рис. 5.8. Биолюминесцентные спектры Ca<sup>2+</sup>-регулируемых реакций,  
с участием разных фотопротейнов:  
1 – обелин, дикий тип; 2 – мутантная форма обелина Y138F; 3 – акворин



## 5.4.2. Структура Са-связывающего участка фотопротеинов.

По строению своего Са-связывающего участка фотопротеины принадлежат к так называемому семейству *EF*-руки. Все белки этого семейства имеют сходное строение центров, ответственных за связывание ионов кальция.

Структура Са-связывающего центра имеет вид спираль – петля – спираль, и каждый элемент этой структуры содержит 12 аминокислотных остатков. Принято сравнивать Са-связывающие центры с правой рукой. При этом отставленные большой и указательный пальцы соответствуют двум  $\alpha$ -спиральным участкам, а остальные сложенные пальцы как бы изображают петлю. Отсюда и название этого семейства белков.

Такая структура обладает необходимыми для надежного связывания кальция свойствами: она имеет повышенную гибкость, что обеспечивает взаимодействие как с полностью гидротированным ионом кальция, так и ионом, потерявшим часть молекул воды. Гибкость структуры необходима также для того, чтобы окружить ион кальция со всех сторон, как бы спрятать его от окружающей среды.

Каждый аминокислотный остаток 12-членной петли играет определенную роль. А в положениях 1, 3, 5, 7, 9 и 12 располагаются кислородосодержащие аминокислотные остатки, обеспечивающие связывание иона кальция. Положения 8 и 10 часто занимают гидрофобные остатки, как бы экранирующие ион кальция от молекул воды. Остатки глицина, зачастую расположенные на позициях 4 и 6, придают петле большую гибкость, столь важную на первых этапах дегидратации ионов кальция. Высокая степень структуры катион-связывающих участков приводит к тому, что все белки семейства *EF*-руки имеют очень похожую трехмерную структуру. Кальций-связывающие участки легко опознаются в первичной структуре белков.

При связывании иона кальция с петлей происходит изменение положения  $\alpha$ -спиральных участков, входящих в состав центра. Это приводит к существенным конформационным изменениям белковой молекулы. Именно это явление лежит в основе способности Са-связывающих белков регулировать многие процессы, происходящие в клетке. Как уже упоминалось, связывание кальция фотопротеинами приводит к тому, что белок утрачивает связь с перекисью люциферина. Перекись при этом теряет стабильность и превращается в окисел, попутно отделяя  $\text{CO}_2$  и испуская синий свет.

Акворин и обелин относятся к классу белков, имеющих три *EF*-центра. Как правило, у этих белков один из *EF*-центров потерял способность связывать кальций из-за изменения структуры первой Са-связывающей петли.



### 5.4.3. GFP – вторичный эмиттер биолюминесценции кишечнорастворимых.

В 1962 году О. Шимомура, Ф. Джонсон и Ю. Сайга отметили разницу между цветом биолюминесценции живой аквории (биолюминесценция *in vivo*) и выделенным из нее комплексом светящегося вещества с акворином (биолюминесценция *in vitro*). У живой медузы свечение зеленое с максимумом 508 нм. А чистый комплекс, реагируя с ионами кальция, испускает синий свет (максимум 465 нм). Оказалось, в светящихся энтодермальных клетках аквории присутствует, кроме акворина, еще и другой – зеленый флуоресцирующий белок. Если облучить его синим или ближним ультрафиолетовым светом (в спектре возбуждения максимум 395 нм, второй пик – 475 нм), он излучает зеленый свет с максимумом 508 нм. Была установлена аминокислотная последовательность зеленого белка (его молекулярная масса составляет 28 кДа), и выяснилось, что он состоит из 238 остатков. Квантовый выход флуоресценции GFP оказался фантастически велик: около 0,8. Следует отметить, что энергия возбуждения акворина отчасти мигрирует на GFP безызлучательно благодаря непосредственному контакту с двумя молекулами GFP (он и существует в виде димера при одной молекуле акворина). Об уникальном строении глобулы и флуорофора GFP было рассказано ранее.

Кроме зеленого белка медузы *Aequorea victoria* подобные ему были найдены у десятков видов других кишечнорастворимых животных: колониальных гидроидных (*Obelia longissima*, *O.geniculata*, *Clytia sp.* и др.) и коралловых полипов – морских перьев (*Renilla muelleri*, *R.reniformis*, *Ptilosarcus sp.*, *Stylatula elonga*, *Acanthophtilum gracile* и т. д.). У всех перечисленных организмов синий свет преобразуется в зеленый. Зачем это им нужно? Считается, что зеленый свет лучше виден в темноте. Другая возможная функция таких флуоресцентных белков – стабилизация молекулы фотопротеина, повышающая квантовый выход свечения.

В растворе между акворином и GFP из *A. victoria* переноса энергии не наблюдается. Однако при их сорбции на диэтиламиноэтил целлюлозных мембранах происходит эффективный перенос энергии. Это объясняется тем, что расстояние между молекулами акворина и молекулами GFP становится достаточно малым для протекания ферстеровского переноса энергии. В случае *Renilla*, биолюминесцентная система которого состоит из целентеразина (люциферина), люциферазы, GFP и кислорода, безызлучательный перенос энергии на GFP происходит даже в растворе. Это указывает на то, что между молекулами люциферазы и GFP *Renilla* существует довольно сильное сродство, приводящее к сближению молекул, обеспечивающему безызлучательный перенос энергии. Несомненно, сродство между люциферазой *Renilla* и GFP *Renilla* намного больше, чем между акворином и GFP *A. victoria*.

## 5.5. Физико-химические механизмы биолюминесценции бактерий

Все известные в настоящее время светящиеся бактерии делятся на две группы: морские и пресноводные. Известно три рода морских светящихся бактерий: *Photobacterium*, *Vibrio*, *Alteromonas*. Среди светящихся бактерий имеются свободноживущие, сапрофитные и паразитирующие формы. Они живут в водах морей от тропиков до высоких широт, редко встречаются в поверхностном слое, в основном их ареал приурочен к зонам повышенной концентрации планктона. По численности светящиеся бактерии могут составлять до 60–70 % от свободно живущих сапрофитов морских вод. Весьма регулярно они встречаются в качестве симбионтов, живущих факультативно в кишечнике, реже в других органах морских рыб, моллюсков, губок.

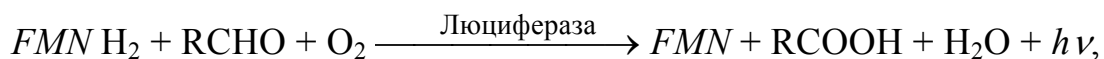
Кислород играет очень важную роль в жизненном цикле светящихся бактерий. Эти бактерии являются облигатными аэробами по свечению. Очень малых концентраций кислорода оказывается достаточно, чтобы бактерии начали светиться, поэтому их даже используют как один из самых чувствительных индикаторов следовых количеств кислорода (от  $10^{-10}$  до  $10^{-5}$  М). Синтез люциферазы в клетках светящихся бактерий зависит также от концентраций в среде  $O_2$ . Да и сама люцифераза обладает высоким сродством к кислороду.

Второй метаболический процесс, на который светящиеся бактерии расходуют кислород, – дыхание. Причем распределение потребления  $O_2$  между процессами свечения и дыхания зависит от условий роста бактерий. Так, в фазе замедленного роста бактерий наблюдается их максимальное свечение благодаря тому, что на свечение идет почти весь поглощаемый кислород.

Обнаружена также критическая (пороговая) концентрация  $O_2$ , ниже которой наступает полное гашение свечения бактерий. При концентрациях  $O_2$  выше критической свечение возрастает гиперболически. По-видимому, распределение  $O_2$  между свечением и биоэнергетическими процессами у светящихся бактерий идет по пути конкуренции между ними за электроны. Однако механизм конкуренции за электроны между свечением и дыханием до сих пор окончательно не ясен.

### 5.5.1. Общая характеристика биолюминесценции бактерий *in vitro*.

Химической основой свечения бактерий является ферментативное окисление восстановленного флавиномононуклеотида  $FMN$   $H_2$  и длинноцепочечного альдегида  $RCHO$  кислородом воздуха. Суммарное уравнение процесса может быть записано так:



где  $FMN$  и  $RCOOH$  – флавинмоноклеотид и карбоновая кислота соответственно.

Структура исходных реагентов и продуктов данной реакции приведена на [рис. 5.9](#).

Бактериальная люцифераза представляет собой гетеродимер с молекулярной массой приблизительно 80 кДа (трехмерная структура этого белка приведена в [прил. 5](#)). Фермент не содержит металлов, неаминокислотных остатков и простетических групп. Каталитической активностью обладает только димер. Роль субъединиц в катализе различна. Опыты по химической модификации и гибридизации, изучению протеолиза люциферазы показали, что активный центр локализован на большой субъединице, тогда как меньшая определяет температурную стабильность фермента и важна для поддержания конформации фермента. На бактериальной люциферазе расположен один центр связывания для  $FMN$  и один – для альдегида.

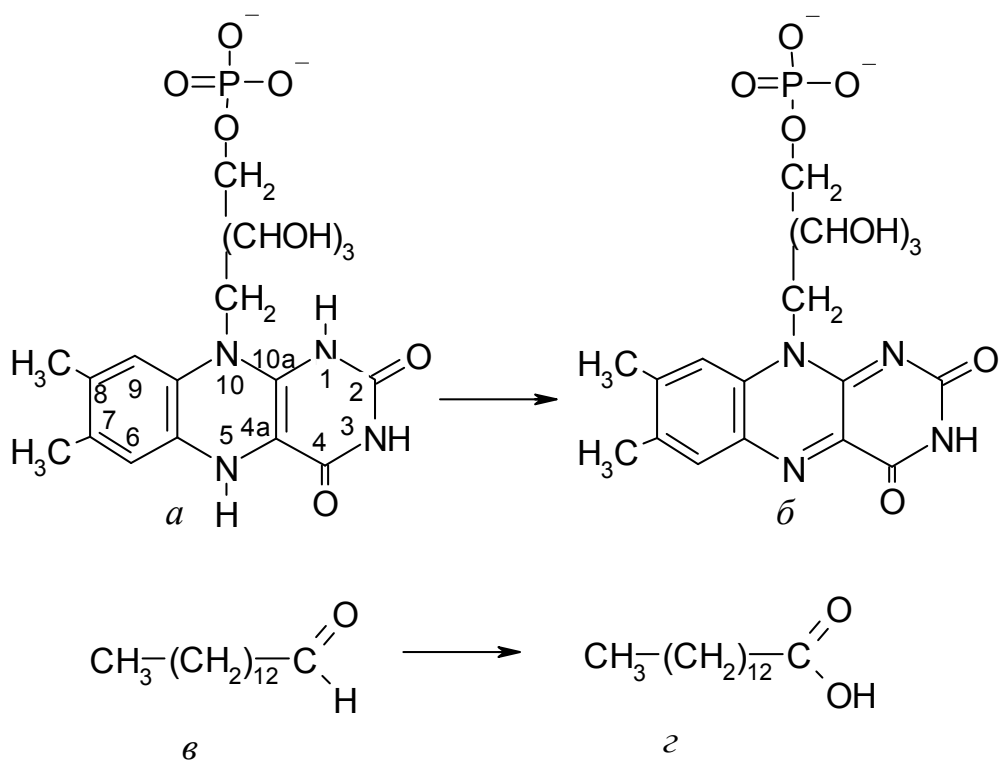


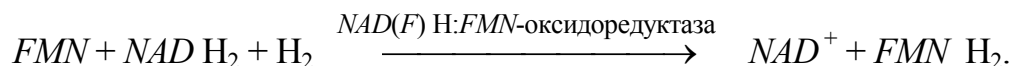
Рис. 5.9. Структура субстратов и продуктов реакции, катализируемой бактериальной люциферазой:  
 $a$  –  $FMN$   $H_2$ ,  $б$  –  $FMN$ ;  $в$  – тетрадеканаль;  $г$  – миристиновая кислота

Компоненты биолюминесцентной реакции способны реагировать и в отсутствие фермента, но эффективность хемилюминесценции такого процесса на 10 порядков ниже. С этой точки зрения некоторые исследователи называют бактериальную люциферазу самым каталитически сильным ферментом из всех известных.

Тепловой эффект реакции составляет  $110 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$ ; он складывается из теплот окисления  $FMN \text{ H}_2$  ( $40 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$ ) и альдегида ( $70 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$ ). Суммарный тепловой эффект реакции превосходит энергию кванта биолюминесценции, равную приблизительно  $60 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$ . В то же время видно, что окисления только восстановленного флавина энергетически недостаточно для излучения наблюдаемого кванта света.

Следует отметить, что ни один из исходных реагентов обсуждаемой реакции не может существовать в бактериальной клетке в свободном виде ( $FMN \text{ H}_2$  – по причине быстрого автоокисления, тетрадеканаль – потому что является ядом и не производится организмами).

Поэтому бактерии имеют специальные ферментативные системы, способствующие восстановлению  $FMN$  и карбоновой кислоты исключительно для нужд биолюминесценции. Считается, что восстановление  $FMN$  в бактериях происходит в реакции, катализируемой  $NAD(F) \text{ H}$ :  $FMN$ -оксидо-редуктазой:



Вопрос о механизме переноса восстановленного флавина между оксидоредуктазой и бактериальной люциферазой остается до сих пор открытым. Существуют косвенные свидетельства как независимой работы этих ферментов, так и образования прочного комплекса между ними.

По отношению ко второму субстрату реакции (альдегиду) люциферазы различных источников имеют различную специфичность. Сродство альдегида к люциферазе обусловлено гидрофобными взаимодействиями между алифатическим фрагментом альдегида и гидрофобными группами фермента. Благодаря этому с увеличением длины углеродной цепи альдегид прочнее связывается с люциферазой. Кроме того, длина алифатической цепи определяет положение карбонильной группы альдегида, участвующей в химических перестройках в активном центре люциферазы. Возможно, поэтому альдегиды с цепью короче, чем у октанола, не участвуют в люминесцентной реакции. Природным субстратом бактериальной люциферазы считается тетрадеканаль, поскольку в бактериях ферментативная система, восстанавливающая для нужд биолюминесценции карбоновую кислоту, имеет специфичность именно к миристиновой кислоте.

Общая схема преобразования реагентов в реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, была предложена более сорока лет назад, и последующие исследования подтвердили ее правильность. Согласно этой схеме реакция проходит через образование трех промежуточных комплексов с ферментом (интермедиатов) (рис. 5.10): I – связанный с люциферазой  $FMN \text{ H}_2$ , II – связанный с люциферазой пероксифлавин и III – связанный с люциферазой перокси-полуацеталь флавина. Методами ЯМР было показано, что основные химические перестройки в ходе реакции происходят на C(4a)-атоме изоаллоксазинового фрагмента флавина (нумерация атомов приведена

на [рис. 5.9](#)). Результаты этих исследований позволили составить последовательность химических перестроек восстановленного флавина в активном центре бактериальной люциферазы ([рис. 5.10](#)). На этом рисунке показана только та часть изоаллоксазинового фрагмента флавина, которая подвергается модификации; рибитилфосфатный «хвост» обозначен RibP.

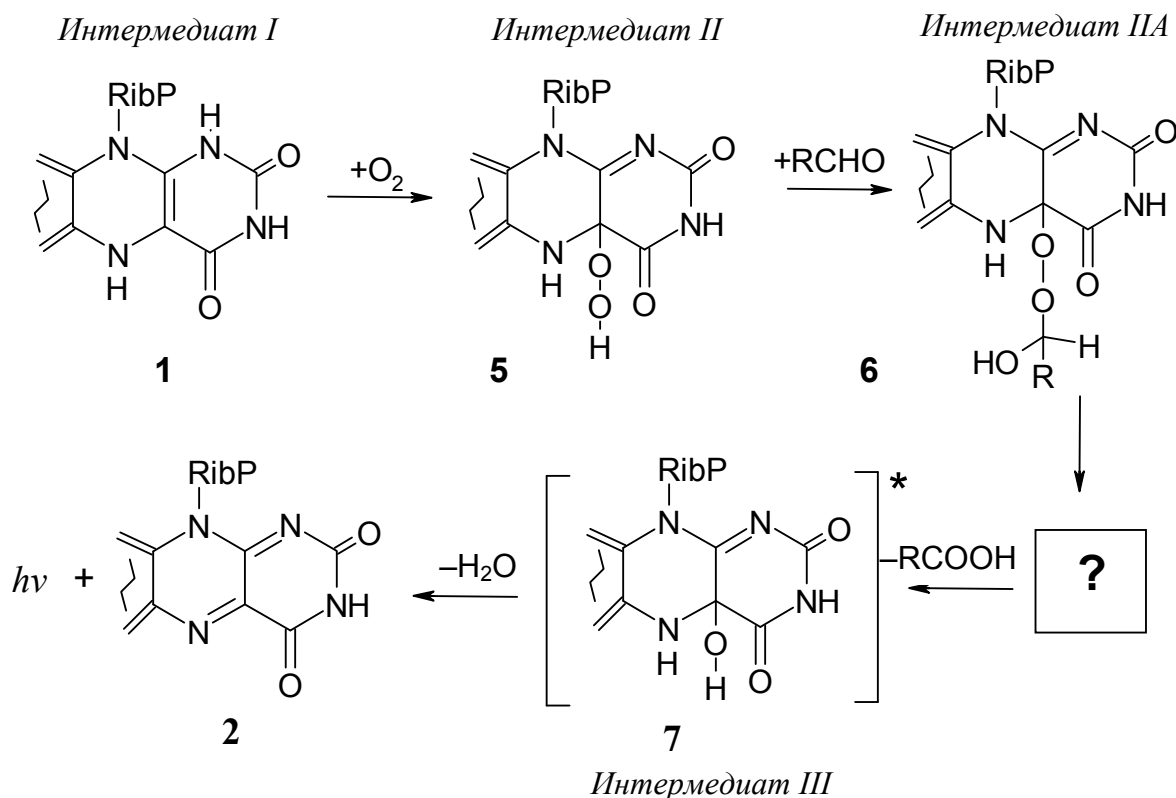


Рис. 5.10. Основные стадии биолюминесцентной реакции бактерий

Относительно механизма преобразования интермедиата IIА (4а-гидропероксиполуацеталь-5-гидрофлавинмононуклеотид ([рис. 5.10](#), 6), связанный с люциферазой) в возбужденный эмиттер до сих пор не существует единого мнения. Этот этап, обозначенный на [рис. 5.10](#) вопросительным знаком, возможно, включает в себя несколько стадий. Проблема идентификации структуры излучающего хромофора (эмиттера) также не решена полностью. Большинство исследователей принято, что эмиттером бактериальной биолюминесценции является связанный с люциферазой 4а-гидрокси-5-гидрофлавинмононуклеотид ([рис. 5.10](#), 7). Назовем этот комплекс интермедиатом III. Спектр фотолуминесценции гидроксифлавина 7 (в связанном состоянии) близок спектру излучения, регистрируемого в результате биолюминесцентной реакции. Более подробно проблема формирования эмиттера будет описана в следующем разделе.

Основные стадии биолюминесцентной реакции бактерий следующие:

1. Образование интермедиатов I, II, ПА. Энергетический интервал возможных возбужденных состояний интермедиатов примерно  $260\text{--}390\text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$  ( $21700\text{--}32700\text{ см}^{-1}$ ).
2. Элементарный акт возбуждения, в котором интермедиат ПА превращается в эмиттер  $P^*$  (интермедиат III).
3. Стадия испускания кванта света:  $P^* \rightarrow P + h\nu$ .

### 5.5.2. Образование эмиттера в биолюминесцентной реакции.

По спектрально-люминесцентным характеристикам было постулировано, что эмиттер бактериальной биолюминесценции имеет структуру 4а-гидроксифлавина ([рис. 5.10](#), 7). Проблема окончательной идентификации 4а-гидроксифлавина как излучающего биолюминесценцию флуорофора заключается в том, что до сих пор не удалось синтезировать это соединение в стабильной форме для того, чтобы подробно описать его спектрально-люминесцентные свойства. Исследованные стабильные аналоги этого соединения, даже если имели подходящие спектры поглощения, очень слабо люминесцировали и вступали в хемилюминесцентные реакции с несравнимо меньшим квантовым выходом ( $10^{-4}\text{--}10^{-7}$ ).

Было предложено множество схем формирования возбужденного эмиттера бактериальной биолюминесценции. Упомянем лишь некоторые из них ([рис. 5.11](#)).



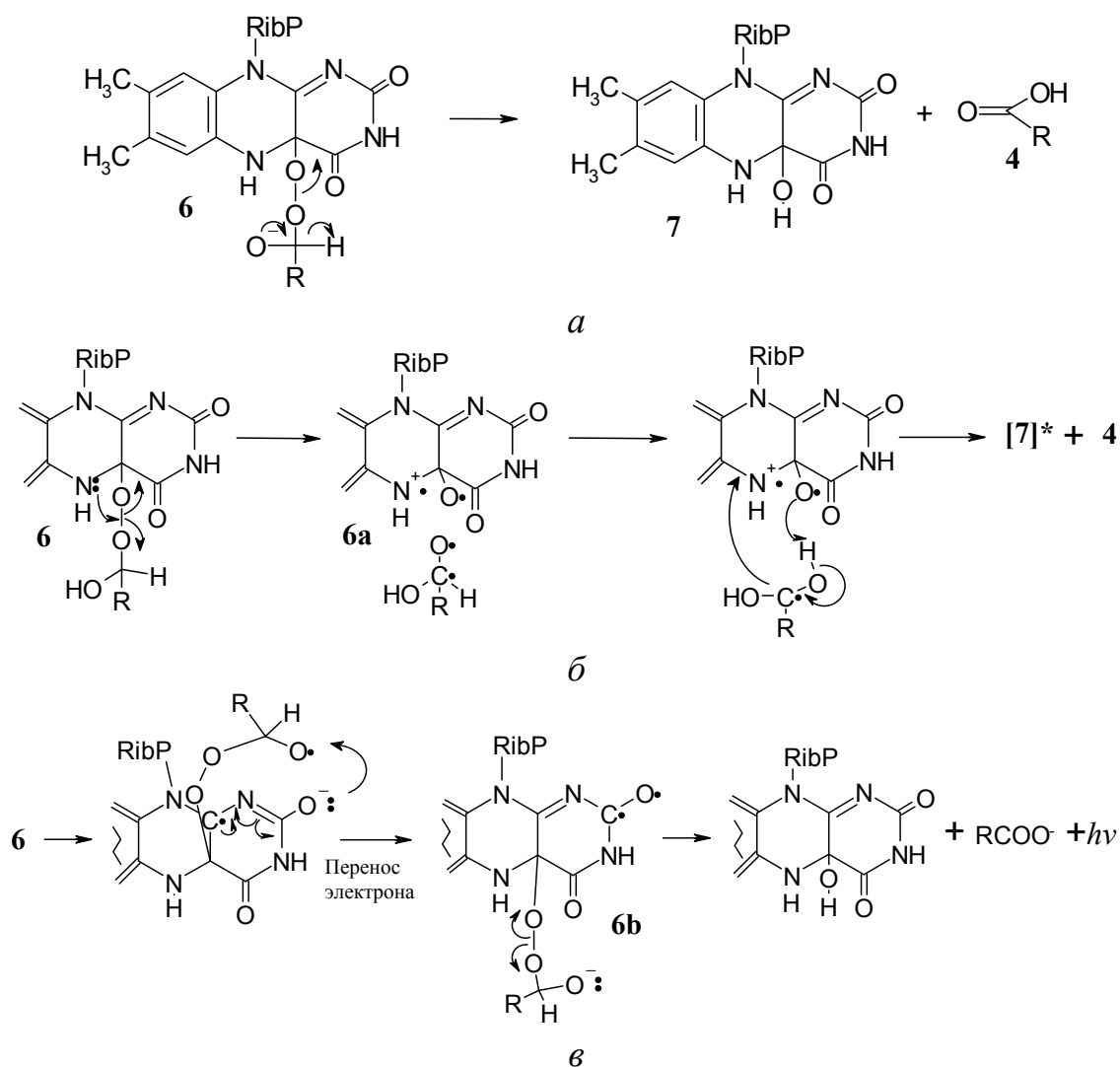


Рис. 5.11. Некоторые из предложенных схем формирования эмиттера бактериальной биолюминесценции: *а* – перегруппировка Байера – Виллигера; *б* – химически инициированная электронно-обменная люминесценция; *в* – формирование высоковозбужденного эмиттера

Первый механизм был предложен в свое время Эберхардом и Гастингсом. Постулируя основные стадии реакции (2), они предположили, что пероксиполуацеталь флавина 6 в составе интермедиата ПА подвергается перегруппировке Байера – Виллигера с прямым образованием карбоновой кислоты 4 и возбужденного гидроксифлавина 7 (рис. 5.11, *а*).

Одним из возражений против этой гипотезы является тот факт, что в химических реакциях перестройки Байера – Виллигера не приводят к образованию электронно-возбужденного продукта.

После открытия такого механизма хемилюминесцентных реакций, как химически инициированная электронно-обменная люминесценция (ХИЭОЛ), Магер и Аддинк попытались адаптировать данный механизм для случая бактериальной биолюминесценции. Напомним, что процесс ХИЭОЛ, характерный для хемилюминесценции некоторых пероксидов, предполагает



следующие стадии: 1) встреча пероксида с донором электрона и образование ион-радикальной пары; 2) конверсия радикал-аниона в карбоксил-радикал и обратный перенос электрона с образованием возбужденного флуорофора. Согласно концепции Магера и Аддинка после формирования пероксиполуацетала флавина 6 в составе интермедиата ПА происходит внутримолекулярная одноэлектронная перестройка с образованием гидроксифлавинового радикал-катиона (6a) (рис. 5.11, б). Эта перестройка заключается в переносе электрона от  $N(5)$  флавина на разрыхляющую орбиталь пероксидного фрагмента и последующей локализации этого электрона на одном из атомов кислорода одновременно с гомолитическим разрывом пероксидной связи. Радикал-катион 6a предполагается ключевым промежуточным соединением в реакции обратного переноса электрона, ведущей к формированию либо возбужденного гидроксифлавина 7, либо возбужденной карбоновой кислоты 4.

Отличительной чертой еще одного механизма, предложенного Кудряшевой с соавторами, является наличие только внутримолекулярных перестроек в процессе формирования возбужденной структуры биолюминесцентного эмиттера при переходе между структурами 6 и 7 (рис. 5.11, в). Данная гипотетическая схема обосновывает возможность заселения высших возбужденных состояний эмиттера биолюминесценции в качестве первично возбужденного состояния через внутримолекулярный перенос электрона с депротонированной кетоимидной группы на пероксиполуацетальный фрагмент интермедиата II. Эмиттер бактериальной биолюминесценции характеризуются низшими  $T_{np^*}$ -состояниями (рис. 5.12). Авторами выдвинуто предположение, что в результате биолюминесцентной реакции происходит образование флавина именно в этом возбужденном состоянии (структура 6b на рис. 5.11, а).

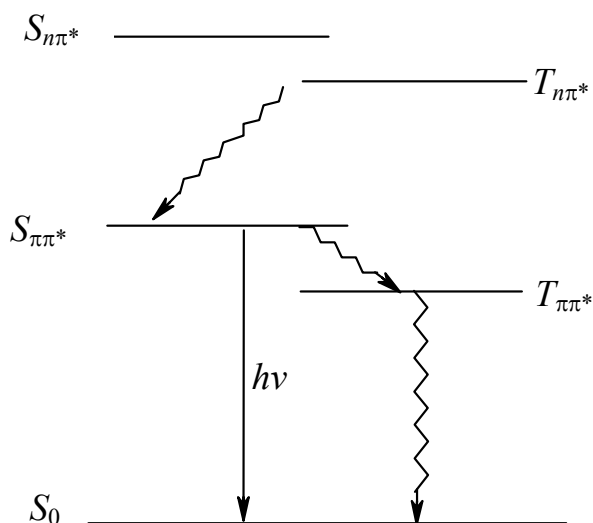


Рис. 5.12. Электронно-возбужденные состояния эмиттера бактериальной биолюминесценции

За образованием возбужденной карбонильной группы следует внутримолекулярный перенос энергии во флуоресцентное состояние  $T_{n\pi^*} \rightarrow S_{\pi\pi^*}$ , который является разрешенным как переход между уровнями разной орбитальной природы и мультиплетности (правило Эль-Саэда). При этом запрет по мультиплетности снимается в результате спин-орбитальных взаимодействий. Описанный выше процесс деградации возбуждения в эмиттере биолюминесценции связан с перестройками в электронной структуре молекулы эмиттера. При этом возбуждение, локализованное на карбонильной группе ( $n\pi^*$ -возбуждение), делокализуется по всей молекуле ( $\pi\pi^*$ -возбуждение). Процесс завершается излучательным переходом  $S_{\pi\pi^*} \rightarrow S_0$  (рис. 5.12).

### 5.5.3. Флуоресцентные белки светящихся бактерий.

То, что в основе свечения бактерий лежит реакция (2), было установлено уже к 1965 г. Но еще долгое время оставалась неясной причина различия спектральных характеристик биолюминесценции *in vivo* и *in vitro*. Положение максимумов спектров биолюминесцентных реакций зависит от типа люциферазы, но при этом ограничивается диапазоном 487–505 нм. Вместе с тем максимумы биолюминесценции живых бактерий различаются гораздо в большей степени. Так, некоторые яркие штаммы светящихся бактерий рода *Photobacterium* излучают свет с максимумом при 475 нм, а биолюминесценция открытого в середине 70-х годов Y1-штамма *Vibrio fischeri* имела максимум при 545 нм. К настоящему времени доказано, что причиной изменения спектрального состава излучения упомянутых выше бактерий является наличие специфических флуоресцентных белков, играющих роль эмиттера биолюминесценции, т. е. в данных случаях имеет место не прямая, или сенсibiliзирoванная, хемилюминесценция.

Флуоресцентные белки светящихся бактерий представляют собой комплексы белка и низкомолекулярного флуорофора, способного флуоресцировать в видимой области спектра. Из бактерий *Photobacterium* был выделен флуоресцентный белок названный «люмазиновым белком» (*LumP*), так как его флуорофором является 6,7-диметил-8-(1'-D-рибитил)люмазин (рис. 5.13, 8). В желто-зеленом штамме *V. fischeri* был найден так называемый желтый флуоресцентный белок (*YFP*) с аналогичной массой и сходной с *LumP* первичной структурой. Флуорофором *YFP* является FMN 2 или рибофлавин (рис. 5.13, 9).

Основные характеристики данных флуоресцентных белков приведены в табл. 5.2.

Таблица 5.2

Сравнительные характеристики флуоресцентных белков светящихся бактерий

№	Характеристика	Значение <sup>a</sup>	
		<i>LumP</i>	<i>YFP</i> <sup>b</sup>
1	Молекулярная масса белка, кДа	21	24
2	Флуорофор	6,7-диметил-8-(1'-D-рибитил)люмазин 12a	флавинмононуклеотид 2
3	Константа связывания флуорофора с белком, М	$1,6 \cdot 10^{-8}$ (20 °C, pH 7)	$1 \cdot 10^{-8}$ (4 °C, pH 7)
4	Максимум длинноволновой полосы поглощения флуорофора в свободном/связанном состоянии, нм	406 / 417	445 / 470
5	Коэффициент молярной экстинкции флуорофора в свободном/связанном состоянии, М <sup>-1</sup> ·см <sup>-1</sup>	10300 (406 нм) / 10300 (414 нм)	12500 (445 нм) / 12500 (460 нм)
6	Максимум спектра флуоресценции флуорофора в свободном/связанном состоянии, нм	490/ 475 (вода)	525/538 (вода)
7	Квантовый выход флуоресценции флуорофора в свободном/связанном состоянии	0,45 (вода, 22 °C) / 0,58(вода, 20 °C)	0,26 (вода, 22 °C) / –
8	Время жизни флуоресцентного состояния флуорофора в свободном/связанном состоянии, нс	8,9 (20 °C) / 1,7 (2 °C)	4,7 (20 °C) / 5,5 (2 °C)
9	Время вращательной корреляции флуорофора в свободном/связанном состоянии, нс	0,15 (2 °C) / 20 (0 °C)	0,2 (0 °C) / 20 (0 °C)
10	Интеграл перекрытия спектра поглощения флуоресцентного белка со спектром биолюминесценции, М <sup>-1</sup> ·см <sup>3</sup>	$2 \cdot 10^{-15}$	$1,54 \cdot 10^{-14}$

Примечание.

<sup>a</sup> В скобках указаны условия регистрации параметра.

<sup>b</sup> Приведены характеристики наиболее изученной формы *YFP* с флавином 2 в качестве флуорофора.

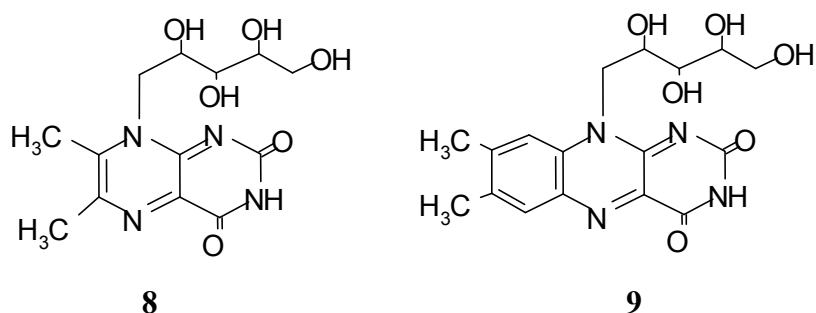


Рис. 5.13. Структура флуорофоров люмазинового и желтого флуоресцентного белка бактерий

Было обнаружено, что в присутствии микромолярных концентраций *LumP* или *YFP*, в зависимости от типа люциферазы, длины углеродной цепи альдегида и источника флуоресцентного белка, могут наблюдаться следующие эффекты: 1) смещение максимума испускания (гипсохромно в присутствии *LumP*, bathochромно – в присутствии *YFP*); 2) увеличение интенсивности излучения (до трехкратного в присутствии *LumP*, до десятикратного в присутствии *YFP*). На механизмах, лежащих в основе таких эффектов, мы остановимся более подробно ниже.

Низкие эффективные концентрации, при которых начинается воздействие флуоресцентных белков на характеристики биолюминесцентной реакции бактерий, указывают на возможность (или даже необходимость) образования ими комплекса с интермедиатами реакции.

Методами флуоресцентной спектроскопии и хроматографии было действительно показано, что *LumP* и *YFP* формируют 1:1 комплекс с интермедиатами II и III (но не с люциферазой в чистом виде). Отсутствие взаимодействия с люциферазой выглядит закономерным, потому что в противном случае присоединение флуоресцентного белка закрыло бы доступ субстратам биолюминесцентной реакции (главным образом, флавину 1) в активный центр этого фермента.

Методом флуоресцентного титрования была определена константа связывания интермедиата III с *YFP*:  $7 \cdot 10^{-7}$  М, что сопоставимо с эффективной концентрацией, при которой начинается действие этого белка на биолюминесцентную реакцию.

**Механизм изменения спектрального состава биолюминесценции флуоресцентными белками.** Сопоставление формы измененных спектров биолюминесценции со спектрами флуоресценции *LumP* и *YFP* при фотовозбуждении однозначно говорит о том, что эти белки участвуют в акте светоизлучения в результате реакции. Вопрос о механизме формирования возбуждения на флуоресцентных белках при внесении их в реакцию (2) до сих пор остается предметом обсуждения и споров.

Самым простым и привлекательным механизмом, отвечающим за возбуждение вторичных эмиттеров, мог бы стать безызлучательный

индуктивно-резонансный перенос энергии (ИРПЭ) с первичного эмиттера за счет слабого диполь-дипольного взаимодействия. Константа скорости такого переноса  $k_{ET}$  определяется уравнением Фёрстера:

$$k_{ET} = A \cdot Q_D \cdot k^2 \cdot \tau^{-1} \cdot (R^{-6}) \cdot J,$$

где  $A$  – константа,  $Q_D$  – квантовый выход флуоресценции донора,  $k^2$  – ориентационный фактор,  $\tau$  – время жизни флуоресцентного состояния донора в отсутствии акцептора,  $R$  – расстояние между донором и акцептором энергии,  $J$  – интеграл перекрывания спектра поглощения акцептора со спектром испускания донора. Со свойствами акцептора связано три величины из этой формулы: расстояние  $R$ , ориентационный фактор  $k^2$  и интеграл перекрывания  $J$ . Первые две величины могут принимать значения, способствующие высокой скорости ИРПЭ с гидроксифлавина 7 на флуоресцентные белки: доказанное существование комплексов интермедиата III с *LumP* и *YFP* может обеспечивать близкое расположение и выгодную ориентацию флуорофоров. Остается последний фактор – интеграл перекрывания спектров, который в случае *YFP* имеет высокое значение, а в случае *LumP* – низкое ([табл. 5.2](#)).

Именно малый интеграл перекрывания спектра поглощения *LumP* со спектром биолюминесценции вызывает возражения против эффективного акцептирования энергии этим белком по индуктивно-резонансному механизму. Поначалу эффект люмазинового белка объясняли существованием высокоэнергетического предшественника эмиттера бактериальной биолюминесценции. Предполагалось, что этот предшественник передает энергию электронного возбуждения либо гидроксифлавинолу, либо люмазиновому белку. Впоследствии, однако, эффективность ИРПЭ стали объяснять особой ориентацией донора и акцептора при малом интеграле перекрывания спектров. Расчеты показывают, что фиксированное расстояние в 1,5 нм и выгодная взаимная ориентация между флавином 7 и люмазиновым флуорофором 8 могут компенсировать малый интеграл перекрывания спектров и объяснить наблюдаемую высокую эффективность «антистоксовой» миграции энергии возбуждения на *LumP*. Следует отметить, что спектральные свойства такой донорно-акцепторной пары, как интермедиат III – *LumP*, а именно близкое расположение максимумов спектров испускания донора и акцептора (490 и 475 нм соответственно), не позволяют исследовать перенос энергии классическими методами флуоресцентной спектроскопии. Обычно скорость переноса энергии определяют по изменению квантового выхода донора в присутствии акцептора (при возбуждении в полосу поглощения донора).

Изучение процессов миграции энергии в системе биолюминесцентный эмиттер – *YFP* облегчено по сравнению с системой с *LumP* из-за наличия большого красного сдвига между максимумами излучения предполагаемого донора и акцептора энергии. Это позволяет эффективно разделить

испускание донора и акцептора и, как следствие, более точно измерить скорость переноса энергии по изменению времени жизни флуоресцентного состояния донора. Такое исследование было проделано. Было найдено, что скорость ИРПЭ для системы с *YFP* больше приблизительно в 10 раз, чем аналогичный параметр для системы с *LumP*. При этом интегралы перекрывания спектра поглощения со спектром биолюминесценции *LumP* и *YFP* различаются в 7,7 раза. Этот результат может быть косвенным подтверждением предположения о том, что возбуждение вторичных эмиттеров происходит за счет слабого диполь-дипольного взаимодействия по фёрстеровскому (индуктивно-резонансному) механизму.

Спектры биолюминесценции в присутствии *YFP* состоят из двух полос – интенсивной желто-зеленой с максимумом около 540 нм и слабоинтенсивной голубой полосы с максимумом при 490 нм. Для описания механизма формирования такого спектра была предложена схема, согласно которой *YFP* образует комплекс с интермедиатом IIА, уменьшая его время жизни. Этот комплекс распадается с формированием возбужденного *YFP*, а «голубая» составляющая биолюминесценции излучается только несвязанным интермедиатом III (рис. 5.14).

Такой механизм похож на межмолекулярную активированную хемилюминесценцию, когда флуорофор катализирует распад пероксида через перенос заряда или электрона, переходя при этом в возбужденное состояние.

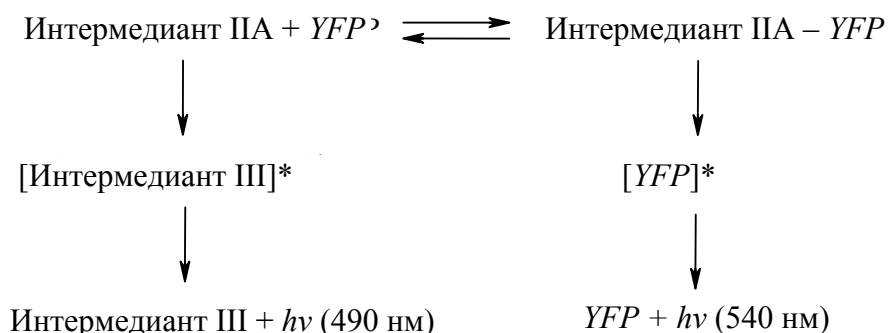


Рис. 5.14. Схема механизма формирования комплекса *YFP* с интермедиатом IIА и его распада

**Изменение интенсивности биолюминесценции в присутствии флуоресцентных белков.** Как уже упоминалось, оба природных флуоресцентных белка бактерий *LumP* и *YFP* вызывают увеличение интенсивности биолюминесценции реакции. Но, как выяснилось, осуществляется этот эффект посредством разных механизмов.

Было установлено, что добавление в биолюминесцентную реакцию *LumP* приводит к увеличению выхода биолюминесценции. Предполагают, что причина этого увеличения заключается в том, что квантовый выход флуоресценции *LumP* (0,58) почти в два раза превышает соответствующую характеристику связанного с люциферазой гидроксифлавина 7 (0,28–0,33). Поэтому сам акт излучения с *LumP* происходит более эффективно. Хотелось



бы отметить, что такое объяснение оправдано, если скорость переноса энергии на *LumP* действительно значительно (в 4–10 раз) превышает скорость собственного излучательного перехода в гидроксифлавине 7.

Квантовые выходы флуоресценции *YFP* и гидроксифлавина 7 отличаются мало, поэтому, несмотря на установленную высокую константу скорости переноса энергии в системе с *YFP*, увеличения общего количества излученных квантов в реакции с участием этого вторичного эмиттера не происходит.

Интенсивность излучения биолюминесцентной реакции в присутствии *YFP* регулируется несколько другим образом. Было показано, что в присутствии этого белка значительно возрастает скорость реакции (2). Уникальным свойством этой системы является то, что с понижением температуры данный эффект усиливается. Максимальная эффективность *YFP*, выраженная как отношение интенсивности при длине волны 540 нм ( $I_{540}$ ) к интенсивности при длине волны 490 нм ( $I_{490}$ ), наблюдается при 4 °С. По мнению некоторых исследователей, эта система чуть ли не единственная среди ферментативных, имеющая отрицательный температурный коэффициент. Было установлено, что потеря активности *YFP* с повышением температуры не может объясняться только диссоциацией флавина и апобелка. Дополнительным фактором, способствующим инаktivации *YFP* с ростом температуры, может быть изменение конформации этого белка при нагревании, но это явление все еще не нашло экспериментального подтверждения или опровержения. Интересно также, что в присутствии *YFP* смещается не только оптимальная температура реакции, но и оптимальная длина углеродной цепи альдегида. Максимальная эффективность *YFP* достигается в реакции с участием октанала, в то время как в отсутствие *YFP* наибольшая интенсивность наблюдается с алифатическими альдегидами, имеющими не менее 12 углеродных атомов. Исследователи объясняют это тем, что в реакции (2) с октаналем наблюдается самое большое время жизни интермедиата ПА (по сравнению с реакциями с участием других альдегидов). Как следствие, *YFP* имеет больше возможности для взаимодействия с этим интермедиатом и для «перетягивания» реакции на путь, ведущий к возбуждению именно «желто-зеленого» флуорофора.

Биологическая роль вторичных эмиттеров светящихся бактерий не совсем ясна. Предположения по этому вопросу делаются, главным образом, исходя из того, что основная функция биолюминесценции сигнальная. С этой точки зрения вовлечение в светоизлучающий процесс *LumP* как минимум дает выигрыш в интенсивности свечения (из-за увеличения выхода биолюминесценции). А *YFP* позволяет бактериям ярко светиться в широком диапазоне температур (от 5 до 25 °С). Предполагают также, что высокая интенсивность свечения желто-зеленых бактерий при 4 °С (т. е. при температуре, когда их метаболические процессы замедлены) делает их привлекательными симбионтами для рыб или других организмов.



## 5.6. Малоизученные типы биолюминесцентных реакций

### 5.6.1. Биолюминесценция динофлагеллят.

Динофлагелляты, или жгутиконосцы, являются основными продуцентами света в море, по крайней мере, в его пелагической, удаленной от берегов части. Жгутиконосцы распространены почти во всех частях Мирового океана и встречаются во все времена года. Изученность светящихся динофлагеллят неодинакова. Относительно хорошо исследованы представители двух родов – *Noctiluca* и *Gonyaulax*.

Излучают динофлагелляты импульсами. Возбужденная клетка через несколько миллисекунд после воздействия раздражителя вспыхивает на 100–300 мс и снова угасает. Излучающими органоидами этих одноклеточных служат так называемые сцинтиллоны, представляющие собой заполненные цитоплазмой кармашки в мембране клеточного вакуоля. Сцинтиллоны содержат люциферазу динофлагеллят и связанный со специальным белком люциферин. Высвобождение люциферина – незамкнутого тетрапиррола ([рис. 5.2, в](#)) происходит при сдвиге pH в сцинтиллоне от 8 до 6. Этот сдвиг pH является результатом открытия ионных каналов в мембране вакуоля. Таким образом, основные стадии биолюминесцентной реакции динофлагеллят можно выразить таким образом:



где *LBP* – люциферинсвязывающий белок, *E* – люцифераза.

Люцифераза жгутиконосцев представляет собой одноцепочный полипептид массой 140 кДа. Каждая молекула люциферазы имеет три центра связывания люциферина ([прил. 5](#)).

### 5.6.2. Свечение червей.

Среди кольчатых червей много биолюминесцентных видов, как морских, так и наземных.

Морские полихеты *Chaetopterus* обитают в U-образных тоннелях, которые они вырывают в донном песке. Биолюминесценция этих червей носит экзогенный характер: под воздействием раздражения они выделяют светящуюся жидкость. Химическая основа такого свечения пока не установлена.

Более изученной является биолюминесцентная система земляных червей. Светящиеся земляные черви (олигохеты) найдены повсюду в мире. Их существует, по крайней мере, 33 вида из 16 родов. В ответ на раздражение земляные черви также выделяют экстракт со специальными клетками, которые разрушаются и испускают свет в сине-зеленой области спектра. Максимумы спектров биолюминесценции земляных червей разных видов

лежат в диапазоне 500–550 нм. Установлено, что люциферинотом земляных червей являются простой алифатический альдегид (*N*-изовалерил-3-амино-1-пропаналь). Биолюминесцентная реакция начинается с образования гидропероксидного аддукта люциферина вследствие взаимодействия альдегида с перекисью водорода. Люцифераза земляных червей представляет собой медьсодержащий фермент с молекулярной массой около 300 кДа. Она катализирует распад гидропероксидного аддукта люциферина с выделением кванта света. Таким образом, светоизлучающая реакция некоторых видов земляных червей является примером вовлечения в биолюминесцентный процесс не молекулярного кислорода, а перекиси водорода.

В лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН (Красноярск) в настоящее время проводят сравнительное исследование биолюминесценции *in vivo* и *in vitro* сибирских кольчатых червей – почвенных энхитреид *Henlea sp.* и *Fridericia heliota*. Для первого вида характерно внеклеточное, экзогенное светоизлучение, а для второго – внутриклеточное. Установлено, что биолюминесцентная система *Henlea sp.* включает четыре компонента: люциферазу (72 кДа), люциферин, ион кальция – активатор люциферазы и кислород. Для биолюминесцентной реакции *F. heliota* необходимо пять компонентов: люцифераза (60 кДа), люциферин (0,5–0,7 кДа), АТФ – косубстрат люциферазы, ион магния – активатор люциферазы – и кислород. По другим параметрам биолюминесценция этих двух видов червей также отличается друг от друга и от остальных известных науке. Максимумы спектров биолюминесценции этих олигохет располагаются при длине волны 478 (*F. heliota*) и 464 нм (*Henlea sp.*). Химическая структура люциферинотом пока не установлена.

### 5.6.3. Биолюминесценция грибов.

К настоящему времени описано более 40 разновидностей люминесцентных грибов. Из них большинство принадлежит ко всем известному типу шляпных грибов, состоящих из ножки (пенька) и шляпки (семейство *Agaricaceae*, подрод *Pleurotus*). Среди сумчатых грибов светящиеся грибы существуют в роде *Xylaria*.

У одних грибов светятся плоды, особенно нижняя поверхность шляпки, у других – только вегетативные, служащие для питания гриба органы, так называемый *мицелий*. Грибы первой категории живут лишь на юге – в южной Европе, еще больше их в странах жарких и тропических. В нашем климате встречаются лишь такие, у которых светится мицелий. Примером такого рода грибов служат опенки (*Armillaria mellea Vahl.*). Мицелий имеет вид светлых и темных нитей или лент, которые пронизывают дерево, вызывая или способствуя его разрушению. Как сила, так и окраска испускаемого грибами света различна. Интенсивность биолюминесценции меняется не только с видом гриба, но неодинакова у одного и того же гриба в разное время жизни. У некоторых, например у *Pleurotus Gardneri*, свет так силен, что при нем легко можно читать. Светящийся *Polyporus annosus* замечен в темноте на

расстоянии 20 метров. Биолюминесценция опенка обыкновенного имеет ежедневный ритм испускания с максимальной интенсивностью около 7:30 и минимальной интенсивностью около 19:30.

Могут светиться старые, гнилые грибы, например, сыроежки и грузди, но не сами собой, а благодаря живущим на них маленьким шляпным грибкам из рода *Collybia* (*C. tuberosa* Bull. и *C. cirrhata* Pers.).

Изучение биолюминесценции грибов проходит сейчас на этапе каталогизации. Составление каталога биолюминесцентных грибов – трудная задача, так как некоторые грибы в пределах одной разновидности имеют радикально различные биолюминесцентные свойства или вообще не светятся.

Физико-химические основы свечения грибов пока еще изучены мало. Одни исследователи видят в нем строго внутриклеточный процесс, другие считают, что гриб выделяет особые вещества, которые легко окисляются кислородом воздуха и при этом светятся. На настоящий момент считается, что биолюминесцентная реакция грибов происходит без участия люциферазы, что отличает эти светящиеся организмы от всех других.

Максимальная длина волны излучения грибов приходится, как правило, на 520–530 нм.

## 5.7. Физико-химические основы биолюминесцентного анализа

Биолюминесценция *in vivo* и *in vitro* нашла широкое применение в качестве аналитических методов и биотестов для решения проблем охраны окружающей среды, в научных исследованиях, в образовании. Биолюминесцентные методы используются для анализа метаболитов, ключевых ферментов, токсинов, мутагенов и других веществ, воздействующих на живые организмы.

Три основные обстоятельства определяют перспективность применения биолюминесценции для анализа.

1. Высокая чувствительность современных методов детектирования излучения в оптическом диапазоне.

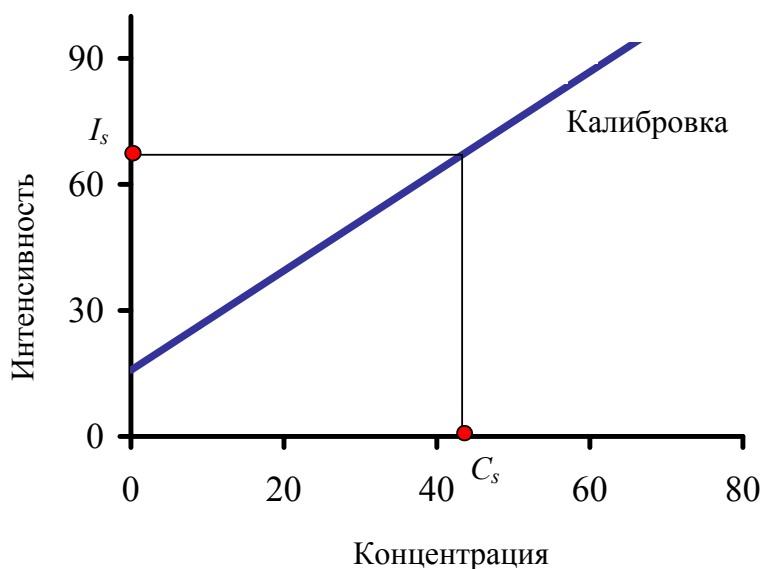
В приложении к биолюминесценции это означает теоретическую возможность измерять единичные молекулярные события. Реальному достижению такой чувствительности препятствуют различного рода шумы, но есть данные об экспериментально достигнутой чувствительности при биолюминесцентном анализе для некоторых веществ (АТФ, НАДН) до 0,1–0,001 фемтомоля, т. е. всего  $10^5$ – $10^6$  молекул.

2. Возможность использования цепей сопряжения других ферментов с люциферазой.

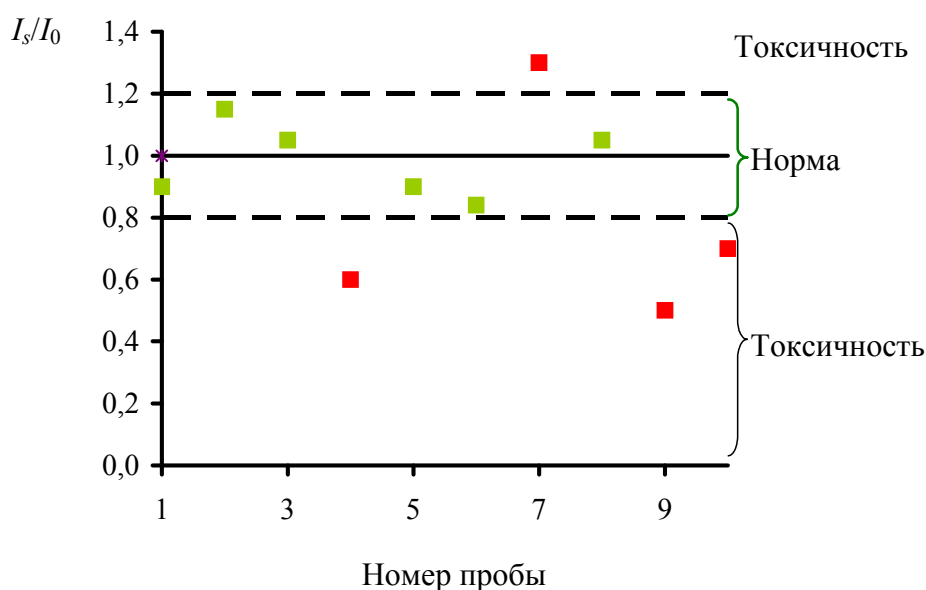
Поскольку энергетическое обеспечение биолюминесценции осуществляется через общие метаболические пути клетки, то появляется возможность искусственно строить цепи сопряженных ферментов таким образом, что концентрация большинства ключевых метаболитов (и

соответственно антиметаболитов) может быть измерена через биолюминесценцию.

3. Высокая специфичность и чувствительность биолюминесцентных методов определяется фермент-субстратным взаимодействием.



а



б

Рис. 5.15. Общие принципы избирательного биолюминесцентного анализа (а) и биолюминесцентного биотестирования (б):  $I_0$  – интенсивность биолюминесценции в отсутствии анализируемой жидкости;  $I_s$  – интенсивность биолюминесценции после добавления анализируемой жидкости;  $C_s$  – искомая концентрация анализируемого вещества

В настоящее время развиваются два направления биолюминесцентного анализа: *методы избирательного анализа* и *биолюминесцентные*

интегральные биотесты. В первом случае по интенсивности биолюминесценции судят о концентрации какого-то конкретного вещества в анализируемом объекте ([рис. 5.15, а](#)). Во втором – по свечению делают вывод об общей токсичности исследуемого образца для живых организмов ([рис. 5.15, б](#)). Количество разработанных биолюминесцентных методов превышает 1000.

При проведении анализа в качестве биолюминесцентной системы используются как светящиеся организмы в целом (главным образом бактерии), так и выделенные из них ферментативные реакции.

### 5.7.1. Применение светящихся бактерий.

Светящиеся бактерии применяются в различных областях в трех основных видах: природном (интактном), мутантном и рекомбинантном.

Биолюминесцентные биотесты с использованием природных светящихся бактерий основаны на исключительной чувствительности этих микроорганизмов к разнообразным веществам. При действии этих веществ на целые живые бактерии исключается их прямое влияние на люциферазу, так как клеточные мембраны препятствуют проникновению ксенобиотиков в клетку. Тем не менее токсичные вещества влияют на важные жизненные процессы клетки, такие как, например, дыхание, которые тем или иным образом связаны с биолюминесценцией.

Природные светящиеся бактерии очень чувствительны к изменению концентрации кислорода, что позволяет их использовать для определения содержания этого газа в смесях газов и жидкостях. Как следствие, были разработаны биолюминесцентные методы исследования оксигенирования миоглобинов и гемоглобинов, активности цитохромоксидазы митохондрий и других кислородзависимых процессов и явлений.

Многообразие методов с применением природных светящихся бактерий отражено в [прил. 5](#).

Среди мутантных форм светящихся бактерий практическую ценность имеют те, у которых нарушен синтез компонентов биолюминесцентной реакции или у предшественников которых были подобные нарушения. Такие бактерии отвечают увеличением светоизлучения на добавление вещества, обеспечивающего образование недостающего компонента. Примером могут служить темновые штаммы *B. harveyi* и *P. fischeri*, свечение которых стимулируется только при введении в среду длинноцепочечных альдегидов и жирных кислот. Чувствительность такого биолюминесцентного метода достигает для альдегида  $10^{-9}$  моль.

Прогресс в области генной инженерии позволил создать новые светящиеся организмы. Было проведено клонирование и экспрессия генов люминесцентной системы (так называемого *lux*-гена) светящихся бактерий *Vibrio harveyi*, *V. fischeri* и *Photobacterium leiognati* в плазмидном векторе клеток различных микроорганизмов.



Таким образом, были созданы биолюминесцентные рекомбинантные штаммы *E.coli*, *Pseudomonas*, *Rysobium* и других бактерий. Введение *lux*-гена позволяет создавать люминесцентные биосенсоры, обладающие высокой специфичностью. Под термином «биосенсор» понимают устройство, в котором чувствительный слой, содержащий биологический материал (ферменты, ткани, бактерии, дрожжи, антигены/антитела, липосомы, органеллы, рецепторы, ДНК), непосредственно реагирует на присутствие определяемого компонента и генерирует сигнал, функционально связанный с концентрацией этого компонента. Например, на основе *E.coli* создан биосенсор, с помощью которого можно определять наличие в среде (и в смесях тяжелых металлов) ртути. Принцип действия этого биосенсора заключается в увеличении экспрессии *lux*-генов при наличии в среде ионов ртути. Чувствительность метода выше, чем в атомной абсорбционной спектроскопии. Подобный биосенсор на основе бактерий *Pseudomonas putida* сконструирован и для определения в среде нафталина, толуола, ксилола. Бактерии рода *Rysobium* использованы в биосенсоре, чувствительном к загрязнению почвы. Некоторые штаммы бактерий рода *Salmonella* применяются в биотесте, позволяющем оценить распределение бактерий на поверхности различных пищевых продуктов.

### 5.7.2. Применение биолюминесцентных реакций.

Можно выделить шесть основных направлений применения биолюминесцентных реакций, полученных из различных светящихся организмов:

1. Анализ субстратов люцифераз.
2. Мониторинг АТФ.
3. Определение содержания ионов кальция.
4. Иммуноанализ.
5. Биолюминесцентные репортерные гены.
6. Биолюминесцентная визуализация.

Остановимся на них поподробнее.

**Анализ субстратов люцифераз.** Как уже упоминалось, люциферазы проявляют высокую специфичность к своим субстратам. Интенсивность светоизлучения в реакциях с аналогами люциферинов во много раз ниже интенсивности природных реакций, катализируемых люциферазами. На основе этого свойства биолюминесценции *in vitro* разработано много методов определения содержания субстратов люцифераз в разных средах.

Например, чувствительность анализа алифатических альдегидов разной длины цепи с помощью биолюминесцентной реакции бактерий достигает порядка  $0,5 \cdot 10^{-12}$  моль альдегида в пробе. Этим методом анализируют половые феромоны некоторых насекомых, которые по своей структуре являются альдегидами. Исключительная чувствительность метода позволяет исследовать регуляцию уровня феромонов и их синтез у одной особи, а также определить концентрацию феромона в воздухе для многих видов насекомых.

Связанным с данным направлением биолюминесцентных приложений можно признать широкий круг задач, который решается с помощью методов мониторинга АТФ.

**Мониторинг АТФ.** Биолюминесцентный анализ – наиболее специфичный, чувствительный и быстрый метод определения АТФ. В его основе лежит биолюминесцентная реакция, катализируемая люциферазой светляков. Интенсивность излучения этой реакции пропорциональна концентрации АТФ в реакционной смеси в широких пределах. Благодаря высокому квантовому выходу данной реакции с помощью несложной аппаратуры можно определять ультрамалые количества АТФ.

АТФ содержится во всех живых клетках: растительных, животных, микробных и человека. Чем больше клеток в образце, тем выше в нем содержание АТФ. Предел обнаружения клеток по содержанию внутриклеточного АТФ составляет менее 1000 клеток в 1 мл/г образца.

Области применения АТФ-метрии:

### 1. Медицина:

- обнаружение микробных инфекций в крови, моче и других биологических образцах;
- быстрый подбор антибиотика, определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) антибиотика;
- контроль жизнеспособности спермы, качества донорских материалов и органов при трансплантации;
- оценка иммунного статуса (вместо радиоактивного метода).

### 2. Пищевая, фармацевтическая, парфюмерная промышленность:

- экспресс-анализ уровня микробных загрязнений для контроля качества на всех этапах производства – от исходного сырья до готовой продукции;
- микробиологическая чистота мясомолочных продуктов, соков и напитков, лекарств и косметики – основное условие их длительной сохранности и высоких потребительских качеств.

### 3. Экология:

- контроль стерильности в особо чистых помещениях медицинских и промышленных учреждений;
- контроль микробных загрязнений питьевой и технологической воды;
- оценка состояния активного ила в водоочистных сооружениях;
- подбор биоцидов и штаммов-биодеструкторов для разрушения отходов.

### 4. Технология и биотехнология:

- определение активности штаммов-продуцентов;
- оценка биостойкости полимеров, пластмасс, герметиков, смазочных материалов, лакокрасочных покрытий;
- оценка активности биокатализаторов на основе клеток микроорганизмов;



- определение бактериальных загрязнений в технологических, горюче-смазочных жидкостях.

Измерение АТФ биолюминесцентным методом занимает 1 мин. А полный анализ образца на предмет содержания в нем микроорганизмов, в зависимости от длительности пробоподготовки, требует от 2 минут до 6 часов. Именно поэтому биолюминесцентная АТФ-метрия является основой одного из методов так называемой «быстрой микробиологии». Для сравнения – традиционный микробиологический анализ требует от 24 до 72 и более часов. Кроме того, в отличие от большинства индикаторных методов, используемых в «быстрой микробиологии», биолюминесцентный метод позволяет определять только живые клетки, так как при гибели клетки концентрация внутриклеточного АТФ очень быстро снижается практически до нуля.

**Определение содержания ионов кальция.** Концентрация ионов кальция является внутриклеточным сигналом, ответственным за контролирование многочисленных клеточных процессов. Клетки в состоянии покоя имеют концентрацию кальция 100 нМ, но при активации повышение его уровня может достигать 1000 нМ. Универсальность кальция в качестве внутриклеточного посредника определяется его огромной изменчивостью. Эта изменчивость возникает из-за использования клетками громадного набора сигнальных компонентов, которые могут быть смешаны и подобраны таким образом, чтобы создать широкий диапазон пространственных и временных сигналов, обеспечивающих разнообразие механизмов кальциевой сигнализации. Эта изменчивость используется для контроля процессов оплодотворения, размножения, развития, обучаемости и памяти, мышечного сокращения и секреции. При этом необходимо учитывать высокую токсичность кальция. Превышение его нормальных концентраций во времени и пространстве может привести к гибели клеток, как в результате некроза, так и путем апоптоза.

Для обнаружения малых количеств ионов кальция широко используются биолюминесценция фотопротеинов кишечнорастворимых (главным образом акворина). Вследствие малой инерционности и высокой чувствительности биолюминесцентный метод весьма эффективен при изучении высвобождения и связывания  $\text{Ca}^{2+}$  в биологических системах, например, во время мышечного сокращения. При этом акворин добавляют прямо к изучаемому объекту и по интенсивности биолюминесценции следят за динамикой изменения содержания свободного кальция. Интенсивность биолюминесценции акворина растет монотонно при увеличении концентрации ионов кальция от  $10^{-7}$  до  $10^{-4}$  М. Нормированная на максимум интенсивность пропорциональна концентрации кальция в степени 2,5 в области микромолярных концентраций.

Биолюминесцентные процессы не требуют возбуждения светом в отличие от флуоресцентных зондов или цветных белков, и, таким образом, регистрации сигнала не мешает собственная флуоресценция клеток. Кроме того, акворин не токсичен, не связывает другие двухвалентные катионы в физиологическом диапазоне концентраций и не взаимодействует с внутриклеточными  $\text{Ca}^{2+}$  буферными системами, даже при микроинъекциях в достаточно высоких концентрациях для получения интенсивного сигнала. Преимуществом фотопротеинов является также их устойчивость к фотообесцвечиванию.

**Иммуноанализ.** Люциферазы применяются в качестве ферментов-маркеров в иммуноанализе наряду с пероксидазой хрена и щелочной фосфатазой.

Люцифераза бактерий использовалась в трех основных типах люминесцентного иммуноанализа:

- 1) иммуноанализ, где в качестве метки выбрана люцифераза;
- 2) иммунофакторный анализ, в котором применяются конъюгаты измеряемого вещества с одним из субстратов биолюминесцентной реакции;
- 3) иммуноферментный анализ с эффектом усиления, в котором меткой служит не люцифераза, а ферменты, сопряженные с ней.

Обелин представляет собой удобную биолюминесцентную метку при разработке тестовых систем для иммуноферментного анализа, поскольку соответствует основным требованиям, предъявляемым к такого рода маркерам: стабильность, доступность, высокая чувствительность регистрации, низкий уровень фонового шума, простота аппаратуры, используемой для регистрации. Иммунобиолюминесцентные методы на основе обелина по чувствительности не уступают традиционному радиоизотопному методу.

**Биолюминесцентные репортерные гены.** Технология репортерных генов – одно из главных новых достижений молекулярной биологии последних лет. *Репортерный ген (reporter gene)* представляет собой часть ДНК, кодирующую легко детектируемый, нейтральный для клеток белок. Он может быть искусственно вставлен в клетку с целью мониторинга экспрессии генов, для получения клеточного биосенсора или для определения локализации клетки. Принципы использования репортерных генов проиллюстрированы на [рис. 5.16](#).

Наиболее используемыми в настоящее время биолюминесцентными репортерными генами являются *lux*-ген (кодирует бактериальную люциферазу), *luc*-ген (кодирует люциферазу светляков) и *rus*-ген (кодирует люциферазу из кишечнорастворимого *Renilla*). Появляются новые биолюминесцентные репортерные гены: выделенные из ДНК железнодорожного червя (ген люциферазы, катализирующей излучение

красного и зеленого света), а также кодирующие многоцветные мутанты светляковой люциферазы.

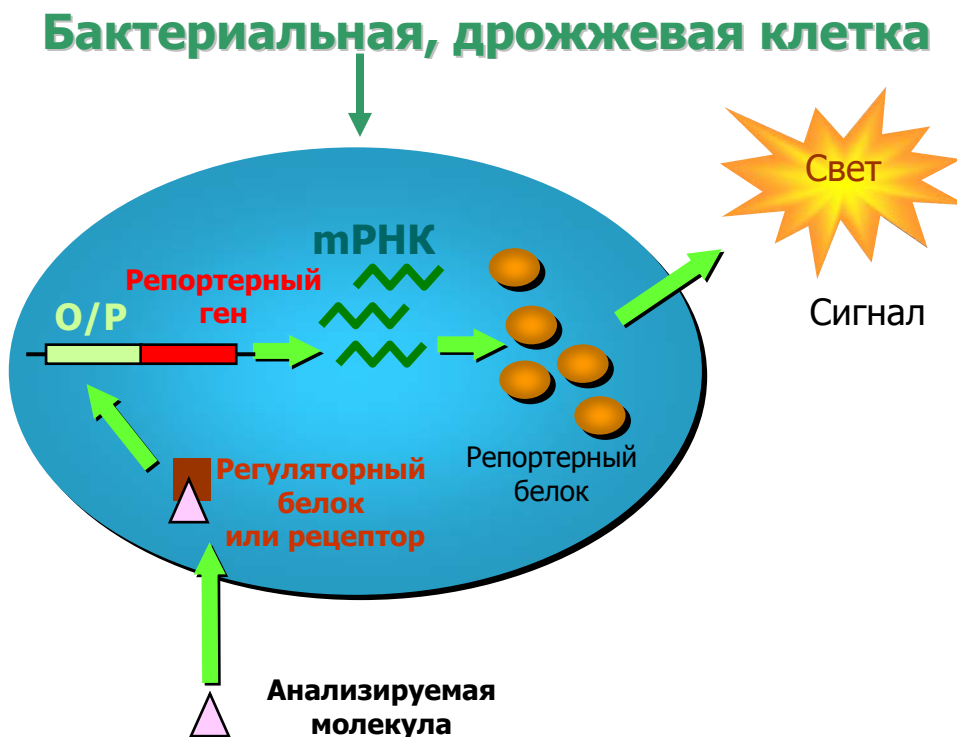


Рис. 5.16. Принцип работы клеточного биосенсора с репортерным геном

**Биолюминесцентная визуализация.** Визуализация биологических процессов *in vitro* и *in vivo* стала возможной благодаря созданию сверхчувствительных видеокамер, способных не только регистрировать сигнал интенсивностью в считанные фотоны, но и определять локализацию этого сигнала на исследуемой поверхности.

Визуализация биологических процессов начинается с того, что биолюминесцентные системы внедряются в клетки, ткани, органы исследуемых объектов. Затем с помощью видеокамеры следят за развитием пространственного распределения свечения, его спектрального состава. Таким образом наблюдают за развитием вирусных инфекций и опухолей, за приживлением трансплантированных тканей. Пример биолюминесцентной визуализации приведен на [рис. 5.17](#).

### 5.7.3. Механизмы влияния химических соединений на интенсивность биолюминесценции *in vitro*.

Имеющиеся данные о влиянии веществ на биолюминесцентные реакции показывают высокую чувствительность систем *in vitro* к действию химических агентов различной природы. Большая часть из этих веществ относятся к токсикантам, оказывающим вредное влияние на организм человека. Это и понятно, так как механизмы ингибирующего влияния

веществ на ферментативные процессы одинаковы для всех живых организмов. Поэтому рассмотрение механизмов угнетения скорости люциферазной реакции будет эквивалентно рассмотрению механизмов токсического действия веществ на ферментативные процессы человека.

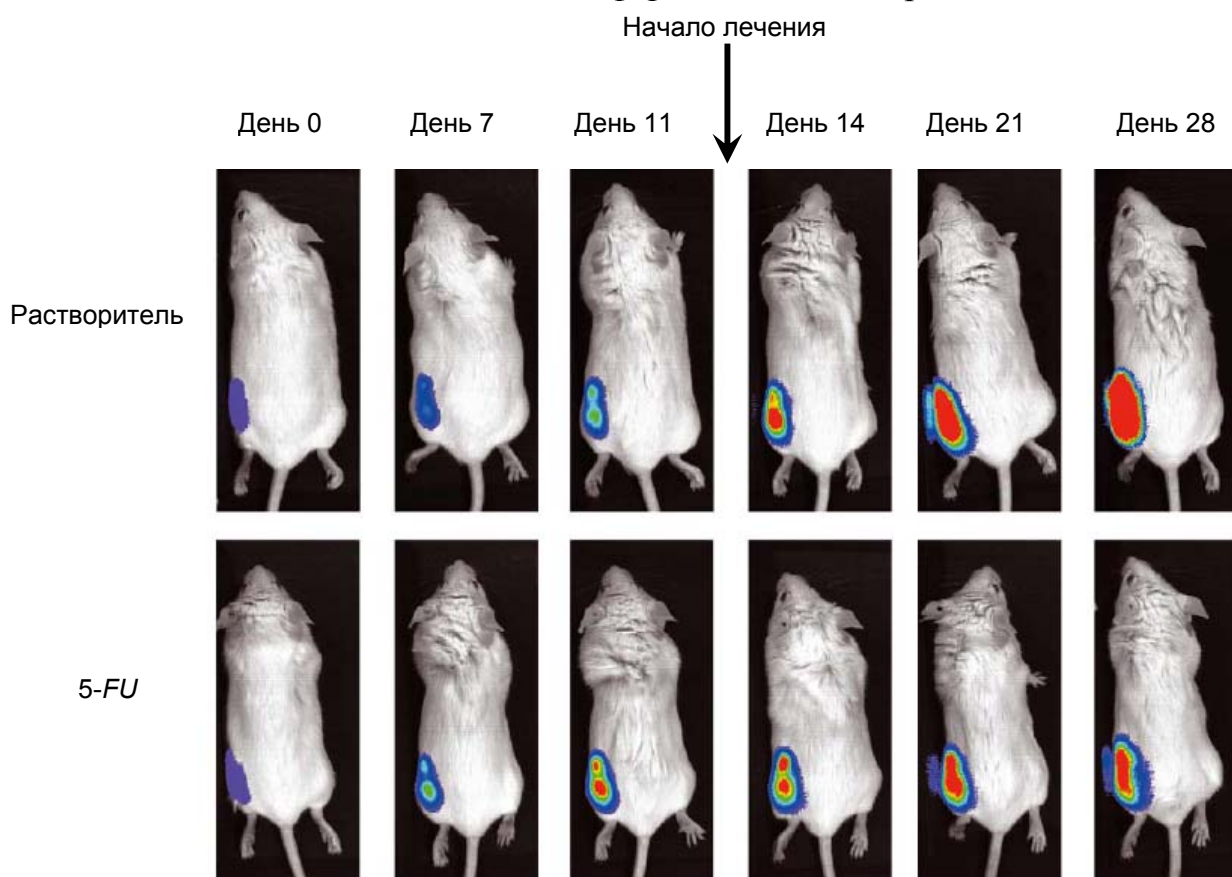


Рис. 5.17. *In vivo*-биолюминесцентная визуализация роста опухоли на теле мыши без лечения (верхний ряд) и с лечением, начатом на 12-е сутки (нижний ряд)\*

Была получена следующая классификация влияний групп соединений на характеристики биолюминесценции с точки зрения элементарных физико-химических процессов.

I. Влияние молекул на процессы переноса энергии в биолюминесцентной системе.

Влияние на процессы миграции энергии возбуждения в биолюминесцентной системе осуществляется на последней стадии биолюминесцентного процесса – на стадии, когда сформировались электронно-возбужденные состояния молекулы эмиттера биолюминесценции. Это влияние можно условно разделить на два вида: 1) акцептирование энергии с электронно-возбужденных состояний биолюминесцентного эмиттера в результате межмолекулярного резонансного переноса энергии; 2) изменение заселенности электронно-возбужденных

\* Источник: Jenkins D. E., Oei Y., Hornig Y. S., Yu S.-F., Dusich J., Purchio T. and Contag P.R. Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis* 20: 733–744, 2003.

состояний эмиттера биолюминесценции без межмолекулярного резонансного переноса энергии. Примером последнего может являться внешний эффект тяжелого атома.

1. **Миграция энергии возбуждения в биолюминесцентной системе** – явление, широко распространенное в природе. Как описывалось выше, для многих видов светящихся организмов характерно участие в процессе излучения света вторичных белков – эмиттеров, которые акцептируют энергию возбуждения с флавин-люциферазного комплекса, внося, таким образом, изменения в спектральные характеристики *in vitro* биолюминесценции.

Закономерности резонансной миграции энергии возбуждения известны из исследований спектров люминесценции растворов флуоресцентных красителей при фотовозбуждении. Условием эффективного переноса энергии между двумя молекулами является перекрывание спектра флуоресценции молекулы донора энергии со спектром поглощения молекулы акцептора энергии. Уровень энергии возбужденного состояния донора должен быть выше, чем уровень энергии акцептора.

При этом можно наблюдать сенсibilизированную (т. е. при заселении электронно-возбужденного состояния в результате межмолекулярного переноса энергии) флуоресценцию молекулы акцептора в длинноволновой (по сравнению со спектром флуоресценции донора) области спектра, характерной для этой молекулы. Квантовый выход сенсibilизированной люминесценции имеет сложную зависимость от концентрации акцептора: при низких концентрациях он растет сначала линейно, а затем проявляет почти квадратичную зависимость; в области высоких концентраций квантовый выход, перейдя через максимум, может начать уменьшаться, приближаясь к стационарному значению.

Аналогичным образом при перекрывании спектра биолюминесценции и поглощения вводимых соединений можно получить сенсibilизированную флуоресценцию этих соединений в биолюминесцентной системе при отсутствии фотовозбуждения.

2. **Внешний эффект тяжелого атома** в биолюминесцентной системе удобно изучать с использованием галогенидов металлов, так как данные соединения содержат анионы с широким интервалом атомных весов при относительно близких химических свойствах. В молекулах, содержащих тяжелые атомы, спин-орбитальная связь значительна. В этих условиях сохраняется полный угловой момент, и правило отбора ( $\Delta S = 0$ ) по спину  $S$  электронной оболочки теряет свою силу. При этом внутримолекулярный синглет-триплетный переход  $S^*_1 \rightarrow T_1$  перестает быть запрещенным, что сказывается на параметрах люминесценции. Подобные эффекты можно индуцировать в молекулах, используя растворители, содержащие тяжелые атомы. Такой эффект получил название внешнего (межмолекулярного) эффекта тяжелого атома. Перечисляя явления, сопряженные с эффектом тяжелого атома, можно назвать увеличение поглощения на переходах  $T_1 \leftarrow S_0$ , уменьшение времени



жизни фосфоресценции, уменьшение квантового выхода флуоресценции, возможность увеличения квантового выхода фосфоресценции.

Эффекты тяжелого атома были исследованы несколько десятилетий назад для случая фотовозбуждения в растворах флуоресцентных красителей. Логично предположить, что эти эффекты будут наблюдаться и в системах с химическим возбуждением в присутствии белка (биолюминесцентные системы). Сложность изучения подобных явлений в биологических системах связана с тем, что помимо чисто физических эффектов, вызванных присутствием тяжелого атома, биолюминесцентная система характеризуется рядом других свойств, определяемых течением химической реакции, активностью фермента.

Исследования показали, что присутствие в биолюминесцентной системе отрицательно заряженных тяжелых атомов уменьшает эффективность биолюминесценции, что сказывается на изменении кинетических параметров биолюминесцентных биотестов.

## II. Перенос электрона.

Перенос электрона (или заряда) является необходимой стадией всех химических и биохимических процессов, в том числе и биолюминесцентных.

Ксенобиотики, способные воздействовать на перенос электрона (заряда), изменяют интенсивность биолюминесцентного сигнала в биолюминесцентной системе. Это может происходить на большинстве стадий биолюминесцентного процесса: при взаимодействии ксенобиотиков с субстратами, на стадиях химического взаимодействия субстратов и эволюции электронно-возбужденных состояний в биолюминесцентной системе. Заряженные соединения (катионы, анионы), диполи, радикалы – наиболее активные ингибиторы (активаторы) переноса электрона. Эффекты солей металлов могут быть рассмотрены с точки зрения электронно-акцепторных (донорных) свойств катионов (анионов). Так, при исследовании ингибирования солей с анионами  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , и  $\text{SO}_4^{2-}$  было показано, что ингибирующая способность солей зависит только от природы катиона.

Исследования показали, что эффект (ингибирование или активация биолюминесценции) зависит от положения катиона металла в таблице Менделеева. Так, оказалось, что соли щелочных ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) и щелочноземельных ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ) металлов активируют биолюминесценцию, а соли *p*-металлов ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Bi}^{2+}$ ) ингибируют ее. Более сложным является действие солей *d*-металлов: катионы с зарядом  $2+$  и вакантными *d*-орбиталями ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$ ) активируют биолюминесценцию ( $\text{FeSO}_4$  – исключение из этой закономерности), а катионы без вакантных *d*-орбиталей ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Hg}^{2+}$ ) ингибируют ее. Катионы с зарядом  $3+$  ( $\text{Cr}^{3+}$  и  $\text{Al}^{3+}$ ) также ингибируют биолюминесценцию.

Полученные закономерности указывают на связь интенсивности биолюминесценции с влиянием катионов на процессы миграции электронной плотности в биолюминесцентной системе. Катионы могут участвовать в



перераспределении электронной плотности в темновом химическом процессе и на стадии образования и дезактивации электронно-возбужденных состояний. Кроме того, важным механизмом воздействия катионов на ферментативные процессы являются их взаимодействия с электронно-донорными фрагментами белков: *S*-атомов *SH*-групп, *N*-атомов боковых групп аминокислотных остатков и т. д.

Активация биолюминесценции катионами может быть объяснена влиянием катионов на стадии образования и эволюции электронно-возбужденных состояний. При этом может образовываться более эффективный дополнительный канал для переноса энергии электронного возбуждения через электронно-возбужденные состояния молекул-акцепторов. Подобный механизм активации предлагался ранее для некоторых хемилюминесцентных (так называемая химически инициированная электронно-обменная хемилюминесценция) и фотохимических реакций. Кроме того, известный эффект – увеличение скорости ферментативных реакций в результате активации ферментативных групп катионами переходных и щелочноземельных металлов. Пример – *Ca*-зависимая биолюминесценция. Таким образом, можно подытожить, что активация катионами биолюминесцентного процесса, вероятно, связана их влиянием на миграцию электронной плотности в результате обратимого присоединения электрона.

Ингибирование биолюминесценции катионами металлов может быть результатом необратимого присоединения электрона. Такие взаимодействия характеризуются отрицательными величинами изменения энергии Гиббса ( $\Delta G_e < 0$ ). При этом при прочих равных условиях чем меньше величина изменения стандартной энергии Гиббса  $\Delta G_e^0$ , тем более эффективно взаимодействие. Ингибирование ферментативных процессов, включая биолюминесцентные, хорошо известно для тяжелых металлов, меди и т. д.

Таким образом, воздействие солей металлов на ферментативную биолюминесцентную систему показывает, что ингибирование и активация биолюминесценции – результат воздействия катионов на процессы миграции электронной плотности. Поскольку миграция электронной плотности является основой всех элементарных физических и химических процессов, следовательно, физико-химические характеристики способности акцептирования электронной плотности ксенобиотиками (средство к электрону, редокс-потенциал) интегрируют все эффекты ксенобиотиков на сложные биологические системы.

### III. Перенос водорода.

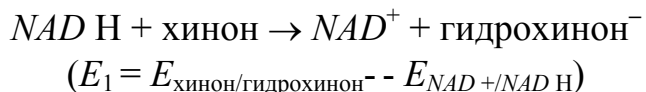
В результате реакции, катализируемой *NAD H:FMN*-оксидоредуктазой, происходит восстановление *FMN* с помощью восстанавливающего реагента *NAD H*. Формально процесс выглядит как присоединение водорода. Однако в таком полярном растворителе, как вода, перенос водорода складывается из

переноса протона и электрона:  $H = e^- + H^+$ . При этом  $NADH$  переходит в  $NAD^+$ , передавая молекуле  $FMN$  протон и два электрона с образованием  $FMNH^-$  (депротонированная форма восстановленного флавина). В водных растворах при нейтральных рН восстановленный флавин на 90 % состоит из депротонированной формы и только 10 % из  $FMNH_2$ , который образуется в результате отрыва протона от подходящего донора, например воды.

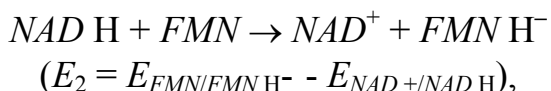
Реакция, катализируемая люциферазой, является биолюминесцентной. В этой реакции восстановленный флавин и алифатический альдегид окисляются кислородом воздуха. В результате реакции образуется окисленная форма флавина, жирная кислота, а также испускается квант света.

Присутствие в системе ксенобиотиков, способных конкурировать с  $FMN$  в процессах присоединения водорода в первой реакции, уменьшает количество восстановленного флавина, следствием чего становится ингибирование биолюминесценции. Пример таких соединений – хиноны. Известно, что хиноны способны специфическим образом менять кинетику биолюминесценции биферментной системы: в присутствии некоторых из них не только уменьшается интенсивность биолюминесценции, но и появляется период задержки свечения (индукционный период) и увеличивается время выхода на максимум биолюминесценции.

Количественно эффективность конкуренции определяется превышением потенциала реакции ( $E_1$ )



над потенциалом реакции ( $E_2$ )



где  $E_{\text{хинон/гидрохинон}^-}$ ,  $E_{NAD^+/NADH}$ ,  $E_{FMN/FMNH^-}$  – окислительно-восстановительные потенциалы соответствующих полуреакций.

Таким образом, в  $NADH$ -зависимой биферментной биолюминесцентной системе хиноны способны конкурировать с  $FMN$  в процессах восстановления (присоединения водорода). Эффективность этой конкуренции определяется стандартным окислительно-восстановительным потенциалом хинона и его концентрацией в биолюминесцентной системе. В кинетике биолюминесценции присутствие активных хинонов проявляется специфическим образом: не только уменьшается интенсивность биолюминесценции, но и растет время выхода на максимум и появляется

индукционный период биолюминесценции.

Существует возможность варьирования чувствительности биолюминесцентных ферментативных *NAD* H-зависимых систем путем увеличения цепи *NAD* H-сопряжения при добавлении в систему других *NAD* H-зависимых ферментов. Так, для изменения чувствительности биолюминесцентной тест-системы проводили сопряжение биферментной системы с третьим *NAD* H-зависимым ферментом – алкогольдегидрогеназой.

Таким образом, рассмотрение биофизических механизмов переноса энергии, электрона, протонов в биолюминесцентных реакциях является основой для разработки ферментативных биотестов. При этом достигается интегральность в действии разных веществ. Установленные корреляции между структурой и свойствами токсикантов, с одной стороны, и их воздействием на рассмотренные кинетические параметры биолюминесценции, с другой, позволяют предсказывать чувствительность биотестов с использованием биолюминесцентных моно-, би- и триферментных реакций.

## **ГЛАВА 6. БИОФИЗИКА И БИОХИМИЯ ФОТОСИНТЕЗА**

[6.1.Эволюция фотосинтеза. Фотохимические реакции в первичной атмосфере Земли.](#)

[6.2.Фотосинтез на пробиотическом этапе эволюции. Зарождение гетеротрофии и автотрофии.](#)

[6.3.Возникновение фотосинтеза, использующего видимый свет. Значение фотосинтеза.](#)

[6.4.История открытия фотосинтеза.](#)

[6.5.Фотосинтезирующие организмы.](#)

[6.6.Световая и темновая фазы фотосинтеза.](#)

[6.7.Основные классы фотосинтетических пигментов.](#)

[6.8.Строение фотосинтетического аппарата.](#)

[6.9.Типы фотосистем.](#)

[6.10.Общая схема фотосинтетического потока электронов.](#)

[6.11.Функциональные взаимодействия компонентов фотосинтетического аппарата.](#)

[6.12.Механизм фотофосфорилирования.](#)

[6.13.Строение АТР-синтазы.](#)

[6.14.Механизм работы АТР-синтазы.](#)

[6.15.Циклическое фотофосфорилирование.](#)

[6.16.Синтез углеводов в фотосинтезирующих организмах. Цикл Кальвина.](#)

[6.16.1.Различия между фотосинтезирующими организмами и гетеротрофами.](#)

[6.16.2.История открытия цикла синтеза глюкозы.](#)

[6.16.3.Цикл Кальвина.](#)

[6.16.4.Баланс реакций цикла Кальвина.](#)

[6.16.5.С3-растения и С4-растения.](#)



[6.17. Организация фотосинтетического аппарата бактерий.](#)[6.17.1. Сравнение бактериального и растительного фотосинтеза.](#)[6.17.2. Фотосистема пурпурных бактерий \*Rhodospseudomonas viridis\*.](#)[6.17.3. Фотосистема архебактерий \*Halobacterium halobium\*.](#)[6.18. Регуляция световых и темновых стадий фотосинтеза.](#)[6.18.1. Фотосинтетический контроль.](#)[6.18.2. Регуляция электронного транспорта.](#)[6.18.3. Регуляция распределения света в хлоропластах.](#)[6.18.4. Регуляция активности ферментов фотосинтетического аппарата.](#)[6.19. Использование люминесценции фотосинтетических пигментов в экологии.](#)[6.19.1. Биофизические методы экспресс-диагностики.](#)[6.19.2. Переменная флуоресценция хлорофилла.](#)[6.19.3. Замедленная флуоресценция хлорофилла.](#)[6.19.4. Хемилюминесценция и термолюминесценция хлорофилла.](#)[6.19.5. Взаимодействие света с фитоценозами.](#)[6.19.6. Методы оценки спектральной эффективности действия видимого излучения на растения.](#)

Фотосинтез – один из важнейших процессов в живой природе, который уже более 200 лет привлекает к себе пристальное внимание ученых разных специальностей: биологов, химиков, физиков, геологов и палеонтологов. Это неудивительно. За счет фотосинтеза растения усваивают энергию солнечного света, синтезируют органические соединения, используемые в качестве продуктов питания животными, и наполняют атмосферу кислородом, обеспечивая тем самым необходимые условия для сохранения и развития жизни на Земле. Фотосинтетические системы – это высокоорганизованные саморегулирующиеся системы. Важнейшими особенностями работы фотосинтетического аппарата являются высокая эффективность преобразования энергии солнечного света, умение фотосинтетических систем адаптироваться к изменяющимся условиям внешней среды и защищать себя от различных неблагоприятных воздействий.

*Фотосинтез* – это процесс образования органического вещества из углекислого газа и воды на свету при участии фотосинтетических пигментов (*хлорофилл* у растений, *бактериохлорофилл* и *бактериородопсин* у бактерий). В настоящее время под фотосинтезом чаще понимается фотоавтотрофная функция – совокупность процессов поглощения, превращения и использования энергии квантов света в различных эндэргонических реакциях, в том числе превращения углекислого газа в органические вещества.

## 6.1. Эволюция фотосинтеза.

### Фотохимические реакции в первичной атмосфере Земли

По данным космологии, науки о происхождении небесных тел, 4,5 млрд лет назад Земля представляла собой сферу, состоящую по большей части из оксидов, карбонатов и карбидов металлов, а также газов, вырывающихся из недр благодаря активной вулканической деятельности. Гравитационные силы привели к уплотнению коры, при этом выделялось огромное количество тепла. Повышению температуры также способствовали распад радиоактивных соединений и поток ультрафиолетового излучения Солнца. Вода находилась в состоянии пара. Высоко над землей в холодном пространстве водяной пар конденсировался, образуя тучи, а затем в виде дождя выпадал на раскаленные камни. Вода вновь испарялась, и пар возвращался в атмосферу. Испарение и конденсация повторялись много раз и приводили к сильным ливням, сопровождавшимся непрерывными молниями. Образовывались неглубокие водоемы, наполняемые дождями. Горячие лавовые потоки и вулканический пепел, попадая в них, создавали разнообразные быстро меняющиеся условия, в которых могли протекать реакции синтеза органических соединений. Атмосфера состояла в основном из паров воды, метана, аммиака, окиси и двуокиси углерода, сероводорода и цианистого водорода ([рис. 6.1](#)).



Рис. 6.1. Типичный земной ландшафт 4,5 млрд лет назад



В настоящее время считается, что начальным этапом возникновения жизни была химическая эволюция – взаимодействие простейших органических соединений, постепенно объединяющихся во все более сложные комплексы. В 1953 году американские исследователи Миллер и Юри провели эксперимент, в котором имитировали условия, существовавшие на Земле 4000 млн лет назад. В специальный воздухонепроницаемый аппарат через систему труб подавалась смесь газов  $\text{CH}_4$ ,  $\text{NH}_3$  и  $\text{H}_2$  (рис. 6.2). Кипящая вода служила источником водяного пара, а с помощью холодильника поддерживалась циркуляция газовой смеси через сосуд, в котором создавался электрический разряд. После непрерывного пропускания искры в течение нескольких дней при напряжении 60 тыс. вольт (что по количеству выделенной энергии эквивалентно периоду в 50 млн лет на атмосфере древнейшей Земли) в водной фазе образовались различные органические соединения. Среди них были обнаружены биологические мономеры: мочевина, молочная кислота, несколько разных аминокислот. Аналогичный опыт еще в 1912 году поставил Ж. Лёб. Однако в то время еще не были разработаны методы обнаружения микроколичеств органических веществ, и он смог среди продуктов реакции выявить лишь одну аминокислоту – глицин, поэтому о его работе забыли.

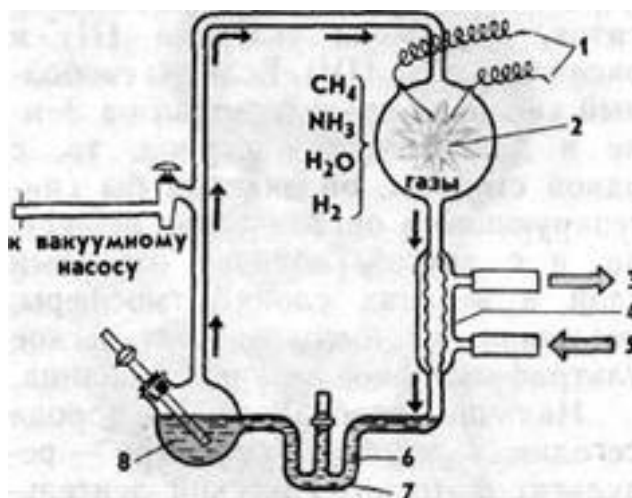


Рис. 6.2. Схема аппарата Миллера: 1 – провода, подводящие электрическое напряжение; 2 – искровой разряд; 3 – отток воды; 4 – холодильник; 5 – приток воды; 6 – вода, содержащая органические соединения; 7 – сифон; 8 – кипящая вода

Углеродсодержащие соединения первичной атмосферы Земли подвергались воздействию других различных источников энергии: высокая температура в районах повышенного вулканизма, ультрафиолетовое излучение, ионизирующее излучение, ударные волны. Были поставлены многочисленные эксперименты с использованием этих видов энергии и различных смесей первичных газов. При нагревании в закрытых сосудах газовых смесей до высоких температур (600–900°C) в присутствии руд различных металлов в качестве катализаторов образовывались не только

аминокислоты, но и некоторые сахара, жирные кислоты и азотистые основания. При воздействии на смесь газов ультрафиолета и  $\gamma$ -излучения синтезировались рибоза и дезоксирибоза. Экспериментально также показано, что облучение синильной кислоты ультрафиолетовым светом ведет к синтезу аденина и гуанина. Обнаружено было также, что облучение смеси метана, аммиака, водорода и воды вызывает образование как пуринов, так и пиримидинов. Во всех экспериментах были получены сходные результаты, подтверждающие теорию абиогенного происхождения органических биологических молекул. При этом выяснилось, что из смеси газов  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}$  и  $\text{CO}_2$  сначала образуются реакционноспособные промежуточные соединения, такие как цианистый водород ( $\text{HCN}$ ), формальдегид ( $\text{HCHO}$ ), муравьиная кислота ( $\text{HCOOH}$ ) и др.

Таким образом, экспериментальным путем в лабораторных условиях было установлено, что различные источники свободной энергии (нагревание, искровые разряды, бомбардировка  $\beta$ -частицами, облучение ультрафиолетом,  $\gamma$ -излучение) приводят к образованию сходных органических веществ. Однако это вовсе не значит, что все они сыграли одинаковую роль в синтезе органических соединений в первичной атмосфере Земли. Из всех вышеперечисленных источников энергии наиболее важным считается ультрафиолетовое излучение Солнца (спектральная область от 200–250 нм).

Ультрафиолет поглощается любыми веществами, повышая их реакционную способность. Вещества, составлявшие тогда атмосферу Земли, поглощают свет с длиной волны короче 240 нм, а формальдегид, который также входил в состав той атмосферы, имеет максимум поглощения света с длиной волны больше, чем 290 нм. В итоге, такая атмосфера прозрачна для ультрафиолетового света в области 240–290 нм. Таким образом, есть все основания полагать, что на заре биологической эволюции ультрафиолетовый свет свободно достигал поверхности нашей планеты, не имевшей тогда кислорода в атмосфере. В результате подобных воздействий простейшие органические соединения многообразно изменялись и усложнялись. Возникали молекулы сахаров, аминокислот, азотистых оснований и других углеродсодержащих соединений, таких, например, как АТФ. Ультрафиолетовое излучение, служившее сначала источником энергии для синтеза простейших органических молекул, на следующей стадии стало ускорять синтез более сложных соединений в поверхностных слоях водоемов.

Важнейшим условием синтеза сложных органических соединений было ничтожное содержание в атмосфере свободного кислорода, всего лишь 0,001 от его содержания в наше время. Он соединялся с такими элементами, как железо, алюминий, кремний, образуя множество минералов в земной коре. Входил он также в состав воды и таких газов, как оксид углерода (II) и оксид углерода (IV). Если бы свободный кислород присутствовал на Земле в добиотический период в значительном количестве, то, с одной стороны, он окислял бы синтезирующиеся органические вещества, а с другой, образуя озоновый слой в верхних слоях атмосферы, поглощал бы высокоэнергетическое ультрафиолетовое излучение Солнца.

Какова же дальнейшая судьба образовавшихся органических соединений? Часть из них разрушилась под действием тех же видов энергии, что необходимы были при их синтезе. Такие летучие соединения, как формальдегид и цианистый водород, ушли в атмосферу и лишь частично растворились в водоемах. Жирные кислоты, соединившись со спиртами, могли образовывать липидные пленки на поверхности водоемов, в которых были растворены азотистые основания, сахара и аминокислоты.

В различных частях нашей планеты были различные условия и источники энергии. Поэтому и состав органических веществ, и их концентрация в разных первобытных водоемах были различны. Скорее всего, дальнейшая химическая эволюция органических соединений, приводящая к их усложнению и образованию полимерных молекул, проходила при редчайшем сочетании «счастливых» обстоятельств. Путь от этой смеси органических и неорганических молекул к первой живой клетке был долгим и требовал постоянного источника энергии. В рассматриваемый нами период возникновения жизни, длившийся примерно 1000 млн лет, ультрафиолет был основным источником энергии для синтеза органических веществ.

## **6.2. Фотосинтез на пробиотическом этапе эволюции. Зарождение гетеротрофии и автотрофии**

Жизнь начала развиваться как единство процессов синтеза и распада органического вещества. В поверхностных слоях водоемов днем под влиянием интенсивного ультрафиолетового излучения преобладали процессы распада; на глубине, а также ночью и в поверхностных слоях шел синтез. Абиогенно синтезированные, находящиеся в воде первичного океана Земли органические вещества послужили источником энергии и строительным материалом для первичных живых существ. В настоящее время считается, что при рассмотрении первого этапа формирования жизни нельзя противопоставлять гетеротрофный и автотрофный способы обмена веществ. В первичной атмосфере шли фотохимические реакции синтеза органических соединений под влиянием ультрафиолетового излучения Солнца. Эти фотохимические реакции синтеза – несомненный прототип фотоавтотрофии. Энергия, запасенная в результате таких фотохимических реакций, использовалась для новых синтезов. В этом можно усматривать зачатки гетеротрофного обмена.

Несколько лет назад была предложена гипотеза, что антенной для ультрафиолетовых квантов был аденин и остатки других пуринов и пиримидинов. В соответствии с этой гипотезой возбужденный квантом света аденин фосфорилируется, давая изомер АТФ, третий фосфорил которого находится при аминогруппе аденина. После переноса фосфорила с аденина на второй фосфат АТФ отделялась от аденина. Макроэргическая молекула АТФ затем могла использоваться в качестве источника энергии при других

синтетических реакциях. Таким образом, первичная автотрофия связана с фотохимическими реакциями абиогенного фотосинтеза.

Химическая эволюция и эволюция пробионтов длилась 1000–1500 млн лет. За это время условия на Земле существенно изменились, и запасы органических молекул, образованных на первой стадии биопозза, постепенно истощались. По мере истощения запаса абиогенного органического материала возникала жесткая конкурентная борьба за него, что ускорило процесс эволюции первичных гетеротрофов.

Сегодняшние знания о составе атмосферы древней Земли позволяют заключить, что первые организмы были анаэробными гетеротрофами, так как они появились в среде без кислорода. Они размножались, получали пищу и энергию из органических и минеральных веществ абиогенного происхождения, в изобилии имевшихся в окружающей среде. Способом обмена веществ им служило брожение – процесс ферментативного превращения органических веществ, в котором акцепторами электронов служат другие органические вещества, при этом выделяется энергия, запасаемая в молекулах АТФ. Примером такого древнего способа обмена веществ, дошедшего до наших дней, является гликолиз – ферментативный путь бескислородного расщепления сахаров.

Ультрафиолетовое излучение спектральной области 240–290 нм в больших дозах является фактором, разрушающим клетку, а в малых дозах – стимулирующим жизнедеятельность. Большое разнообразие водоемов по глубине и прозрачности воды создавало предпосылки для подбора оптимальных доз ультрафиолетового облучения. Совершенно очевидно, что прото-организмы, способные использовать ультрафиолетовое излучение Солнца для синтеза, оказывались в преимущественном положении по сравнению со своими конкурентами, питающимися абиогенно возникшими органическими веществами. Автотрофия как особенность всего круговорота органического вещества начинает становиться свойством отдельных классов прото-организмов.

Известный исследователь фотосинтеза Д. Арнон предложил даже более широкое по сравнению с общепринятым определение фотосинтеза: «Фотосинтез может быть определен как синтез клеточных веществ за счет химической энергии, полученной при фотохимических реакциях. Это определение включает возможность ассимиляции  $\text{CO}_2$ , но не ограничивается ею». Такое определение фотосинтеза охватывает и примитивный фотосинтез с использованием ультрафиолетовых фотонов. Жизнь с самого начала развивалась, видимо, как круговорот веществ, основанный на взаимодействии фотоавтотрофии и гетеротрофии. Солнечное излучение всегда была основным энергетическим источником жизни. Следовательно, возникновение жизни представляет собой становление механизмов использования фотонов света.

### 6.3. Возникновение фотосинтеза, использующего видимый свет. Значение фотосинтеза

Со временем все меньше ультрафиолетовых квантов достигало поверхности Земли. Причиной тому было образование озонового слоя атмосферы в условиях повышения в ней концентрации кислорода. Кислород образовывался, по-видимому, вследствие фотолиза паров воды под действием того же ультрафиолетового облучения. Чтобы выжить в новых условиях, древние клетки должны были переключиться с ультрафиолетового света на какой-либо иной источник энергии, все еще доступный для них в новых условиях. Таким источником стал, вероятно, видимый свет.

Другой сценарий эволюции мог бы состоять в том, что возникновение фотосинтеза, использующего видимый свет, произошло еще до помутнения атмосферы, а именно при проникновении жизни в более глубокие уровни океана, лишенные ультрафиолета. Замена опасного ультрафиолетового излучения на безопасный видимый свет могла бы быть тем признаком, который лег в основу естественного отбора на данном этапе эволюции. В рамках этой концепции создание озонового слоя имеет биогенную природу, явившись результатом фотолиза воды системой хлорофильного фотосинтеза зеленых бактерий и цианобактерий. Новый фотосинтез должен был, как и прежде, образовывать АТФ, который к тому времени уже прочно занял место в центре метаболической карты, выполняя роль «конвертируемой энергетической валюты» клетки. Однако аденин уже не мог играть роль улавливающей свет антенны, так как его максимум поглощения находится в ультрафиолетовой, а не в видимой области спектра. До нас дошли два типа фотосинтетических устройств, использующих видимый свет: хлорофилл и бактериородопсин. Именно бактериородопсин выглядит как эволюционно первичный механизм улавливания энергии видимого света.

В то время как одни бактерии основывались на гликолизе, другие выработали способность фиксировать атмосферный углекислый газ с образованием различных органических соединений, а третьи научились фиксировать атмосферный азот. В фиксации  $N_2$  участвует система ферментов нитрогеназ, специфически реагирующих с ацетиленом – богатым энергией соединением, – который в больших количествах образовался из цианистого водорода еще до возникновения жизни.

Исключительным событием стало возникновение бактериального фотосинтеза. Он освободил жизнь от зависимости от органических соединений абиогенного происхождения. Скорее всего, фотосинтез возник у анаэробных бактерий, способных к азотфиксации. При этом источником энергии являлось Солнце, а результатом было накопление органических веществ биогенного происхождения. Первые фотосинтезирующие бактерии получали водород путем расщепления органики или сероводорода. Такой фотосинтез называется *аноксигенным* (бескислородным). Лишь потом



цианобактерии (цианобактерии, сине-зеленые) освоили фоторасщепление воды. Побочным продуктом такого фотосинтеза является кислород. Его накопление в атмосфере привело не только к коренному изменению хода эволюции, но и к преобразованию лика планеты.

В результате накопления кислорода в атмосфере сформировался озоновый экран. Появление озонового экрана защитило первичные организмы от смертельного ультрафиолетового облучения и положило конец абиогенному синтезу органических веществ. Теперь жизнь одних организмов зависела только от деятельности других живых организмов. По мере изменения спектра солнечного света, достигающего поверхности Земли, в связи с появлением озона они постепенно приспосабливались к использованию квантов света с меньшей энергией (от 1,3 до 9 электрон-вольт на молекулу), но в больших количествах. Фотосинтез зеленых растений с помощью хлорофилла возник много позднее как эволюционно развившееся приспособление к использованию в биосинтезе фотонов видимого света с меньшей энергией в сравнении с ультрафиолетом.

Сегодня большинство представителей растительного и животного царства – облигатные (обязательные) аэробы; они погибают, если концентрация  $O_2$  в окружающей среде падает ниже той, к которой они приспособлены. Исключения составляют некоторые глубоководные сообщества и ряд кишечных паразитов (глистов), получающих энергию от реакции брожения. Для них кислород ядовит. Многие роды прокариот состоят исключительно из анаэробов, другие включают как анаэробные, так и аэробные виды.

Первые аэробные бактерии появились благодаря приобретению аппарата окислительного фосфорилирования. Продукты брожения подвергались дальнейшему окислению до  $CO_2$  и  $H_2O$ . Эти аэробные гетеротрофы могли более эффективно, чем анаэробные бактерии, расщеплять органические вещества, образующиеся в результате фотосинтеза. По-видимому, с ростом концентрации  $O_2$  в атмосфере усложнялась жизнь первичных анаэробных гетеротрофов. Некоторые из них вымерли. Другие нашли среду, лишенную кислорода, и продолжали в ней анаэробное существование. Примером таких организмов являются дошедшие до наших дней метанобразующие бактерии или серные бактерии, живущие в горячих подземных источниках.



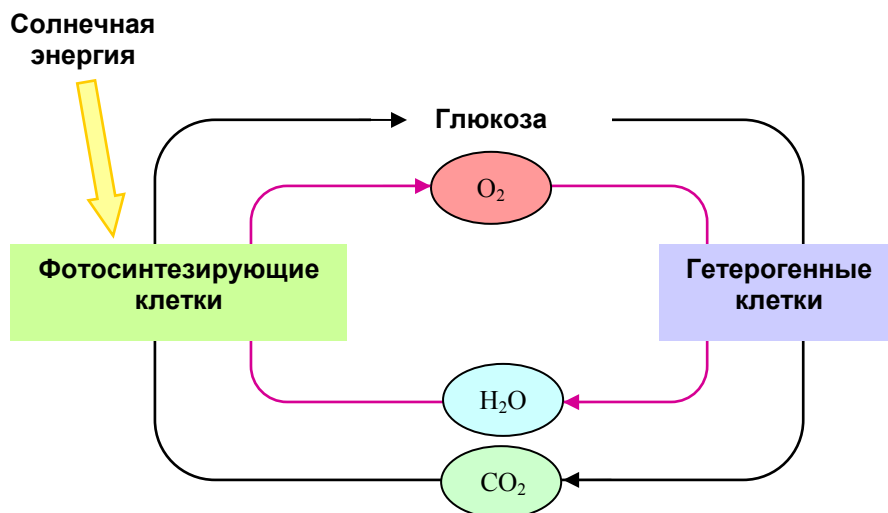


Рис. 6.3. Круговорот углерода и кислорода

Некоторые гетеротрофы пошли по пути, приведшему к образованию эукариотических клеток. Часть из них вступила в симбиоз с аэробными бактериями, способными к окислительному фосфорилированию. Поглотив аэробные бактерии, первичные гетеротрофы не расщепили их на составляющие молекулы, а сохранили в качестве энергетических станций, называемых сегодня митохондриями. Такие симбионты дали начало царствам животных и грибов. Другая часть первичных гетеротрофов «заключила союз» не только с аэробными гетеротрофами, но и с первичными фотосинтетиками, сохранив последние в качестве хлоропластов. Такие симбионты дали начало царству растений.

Солнечная энергия – первичный источник всей биологической энергии. Фотосинтезирующие клетки используют энергию солнечного света для образования глюкозы и других органических продуктов. Эти органические продукты служат гетеротрофным клеткам источником энергии и углерода. Солнечная энергия создает движущую силу для круговорота, в процессе которого атмосферная двуокись углерода и атмосферный кислород непрерывно циркулируют, проходя через биосферу ([рис. 6.3](#)). В продуктах фотосинтеза запасается огромное количество энергии. Ежегодно растительный мир генерирует за счет запасаемой энергии Солнца не менее  $10^{17}$  ккал свободной энергии, что более чем в 10 раз превышает количество энергии полезных ископаемых, потребляемое за год всем населением Земли.

## 6.4. История открытия фотосинтеза

Первым выяснил, что растения выделяют кислород, английский химик и философ Джозеф Пристли около 1770 года. Он обнаружил, что воздух в закрытом сосуде, в котором горит свеча, через некоторое время «портится», так что он уже больше не может поддерживать горение и оказывается непригодным

для дыхания – помещенная в сосуд мышь погибает. Если, однако, положить в сосуд веточку мяты, то воздух в нем постепенно «исправляется»: он вновь приобретает способность поддерживать горение свечи и жизнь зверька. Из этих опытов Пристли сделал вывод, что зеленые растения выделяют кислород – процесс, казавшийся противоположным дыханию животных, при котором происходит потребление кислорода. Как ни странно, но в этих своих очень точных наблюдениях Пристли так и не уловил, что для «исправления» воздуха веточкой мяты нужен свет. То, что свет играет важную роль в этом процессе, установил через несколько лет голландский врач Ян Ингенхауз. Он же установил, что кислород выделяют только зеленые части растений. Затем исследователи нашли, что для питания растений требуется диоксид углерода и вода, из которых создается большая часть массы растений. В 1817 году французские химики Пьер Жозеф Пелатье (1788–1842) и Жозеф Бьенеме Каванту (1795–1877) выделили зеленый пигмент хлорофилл (*chloros* – зеленый; *phyllon* – лист). Позднее российский ученый Климент Аркадьевич Тимирязев (1843–1920) показал, что фотосинтез проходит с наибольшей интенсивностью в тех областях солнечного спектра, где находятся максимумы поглощения хлорофилла.

В XX веке было установлено, что процесс фотосинтеза начинается на свету в фоторецепторах хлорофиллов, однако многие из последующих стадий могут протекать в темноте. Общий процесс является эндотермическим ( $\Delta H^\circ \sim 469$  кДж/моль  $\text{CO}_2$ ). В нем участвует несколько типов хлорофилла, а также другие комплексы магния, железа и меди.

## 6.5. Фотосинтезирующие организмы

Фотосинтез свойственен не только зеленым растениям, но и низшим эукариотическим формам, таким как водоросли, эвгленовые, перидинеи и диатомеи, которые не видны невооруженным глазом ([рис. 6.4](#)). Обладают способностью к фотосинтезу и некоторые прокариоты. К фотосинтезирующим прокариотам относятся цианобактерии (сине-зеленые водоросли), зеленые серные бактерии, живущие в горных озерах, и пурпурные серные бактерии, обычные обитатели серных источников. Таким образом, эволюция фотосинтеза включала переход от анаэробных бактериальных организмов, утилизирующих в качестве донора различные соединения серы, азота, простейшие органические соединения, к цианобактериям, водорослям и высшим растениям, перешедшим к использованию  $\text{H}_2\text{O}$  в качестве источника электронов.

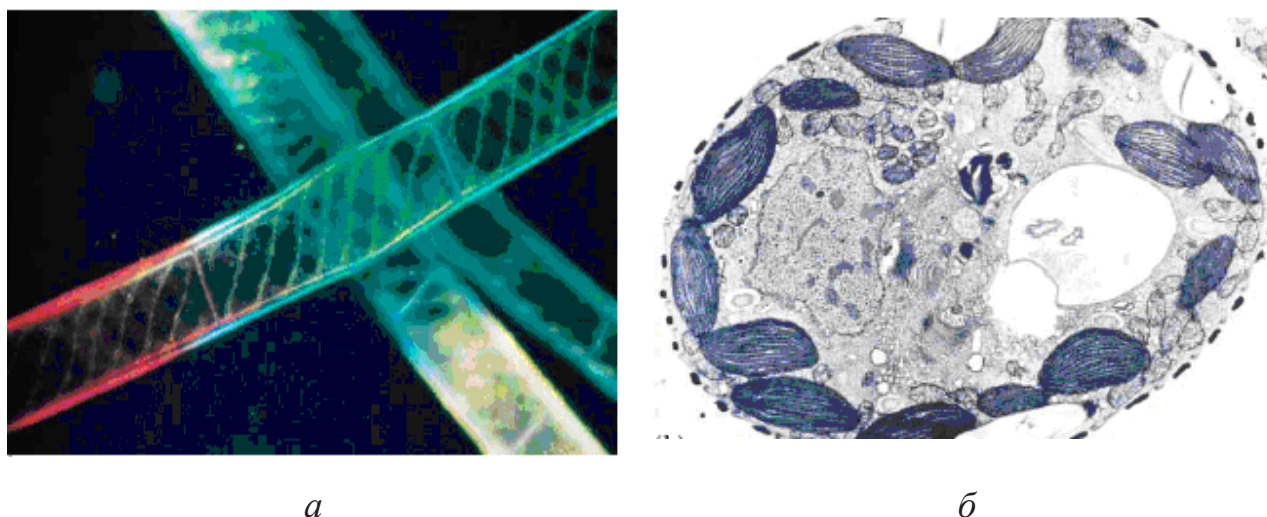
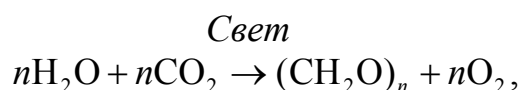


Рис. 6.4. Примеры фотосинтезирующих организмов:  
а) *Spirogyra* – пресноводная зеленая водоросль; б) клетка высшего растения

Фотосинтезирующие организмы можно подразделить на два класса: образующие кислород и не образующие его. Доноры водорода у разных фотосинтезирующих организмов различны.

Зеленые клетки листьев высших растений и цианобактерии принадлежат к продуцентам кислорода. Для восстановления двуокиси углерода они используют в качестве донора водорода воду и в ходе этого процесса выделяют молекулярный кислород согласно уравнению



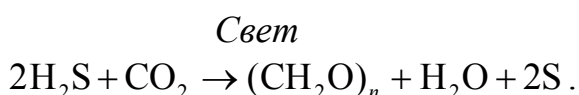
где  $n$  обычно считают равным 6, поскольку конечным продуктом восстановления  $\text{CO}_2$  является глюкоза.

Фотосинтезирующие бактерии (за исключением цианобактерий, см. выше) кислорода не образуют. Более того, многие фотосинтезирующие бактерии являются облигатными анаэробами, т. е. вообще не переносят кислорода. В качестве доноров водорода некоторые фотосинтезирующие бактерии используют неорганические соединения.

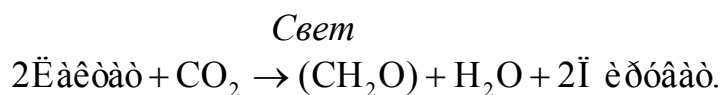
Донор водорода	Окисленный продукт
$\text{H}_2\text{O}$	$\text{O}_2$
$\text{H}_2\text{S}$	$\text{S}$
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \boxed{\text{H}} - \text{C} - \boxed{\text{OH}} \\   \\ \text{COO}^- \end{array}$ <p>Лактат</p>	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{C} = \text{O} \\   \\ \text{COO}^- \end{array}$ <p>Пируват</p>
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \boxed{\text{H}} - \text{C} - \boxed{\text{OH}} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Изопропанол</p>	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{C} = \text{O} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Ацетон</p>

Рис. 6.5. Некоторые доноры водорода (доноры электронов), используемые различными фотосинтезирующими организмами

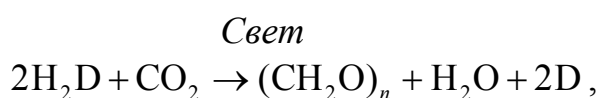
Например, *зеленым серным бактериям* донором водорода служит сероводород, а выделяют они вместо молекулярного кислорода элементарную серу, представляющую собой продукт окисления  $\text{H}_2\text{S}$ :



Другие фотосинтезирующие бактерии используют в качестве доноров водорода органические соединения, например лактат:



Если написать уравнение фотосинтеза в более общей форме, то видно, что у растений и бактерий процессы фотосинтеза в основе своей одинаковы, хотя в них используются разные доноры водорода:



где  $H_2D$  – донор водорода, а  $D$  – окисленная форма этого донора. Роль  $H_2D$  могут играть вода, сероводород, лактат или какие-нибудь другие органические соединения в зависимости от вида фотосинтезирующего организма ([рис. 6.5](#)).

Донором электронов, например, для зеленых растений служит  $H_2O$ ; из нее они выделяют  $O_2$ .

## 6.6. Световая и темновая фазы фотосинтеза

Фотосинтез зеленых растений протекает в две стадии:

1) *первая стадия* объединяет световые реакции, идущие только тогда, когда растение освещено. В световых реакциях энергия света поглощается хлорофиллом и другими пигментами фотосинтезирующих клеток и запасается в химической форме в виде двух высокоэнергетических продуктов –  $ATP$  и  $NADPH$ ; одновременно выделяется кислород.

2) *вторая стадия* – темновые реакции, которые могут происходить как в темноте, так и на свету. В темновых реакциях  $ATP$  и  $NADPH$ , образовавшиеся в световых реакциях, используются для восстановления двуокиси углерода до глюкозы и других органических продуктов ([рис. 6.6](#)). В световых реакциях за счет солнечной энергии образуются высокоэнергетические соединения –  $NADPH$  и  $ATP$ . Эти соединения используются в темновых реакциях для восстановления  $CO_2$ , приводящего к образованию глюкозы.

Образование кислорода, происходящее только на свету, и восстановление двуокиси углерода, для которого свет не требуется, представляют собой, таким образом, два совершенно отдельных процесса. Однако, не смотря на то, что реакции, в которых происходит восстановление  $CO_2$  до глюкозы, могут идти и в темноте, они регулируются светом.

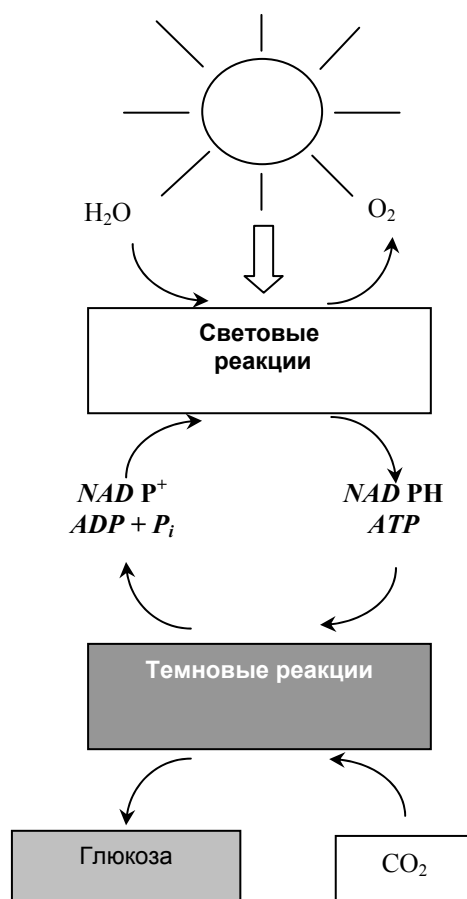


Рис. 6.6. Стадии фотосинтеза

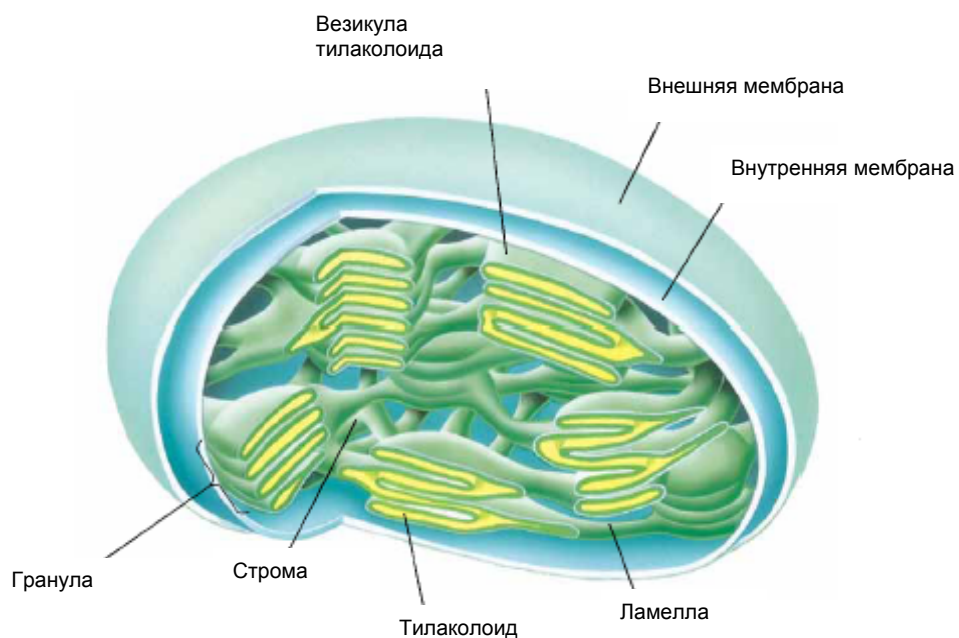


Рис. 6.7. Схематичное изображение хлоропласта.



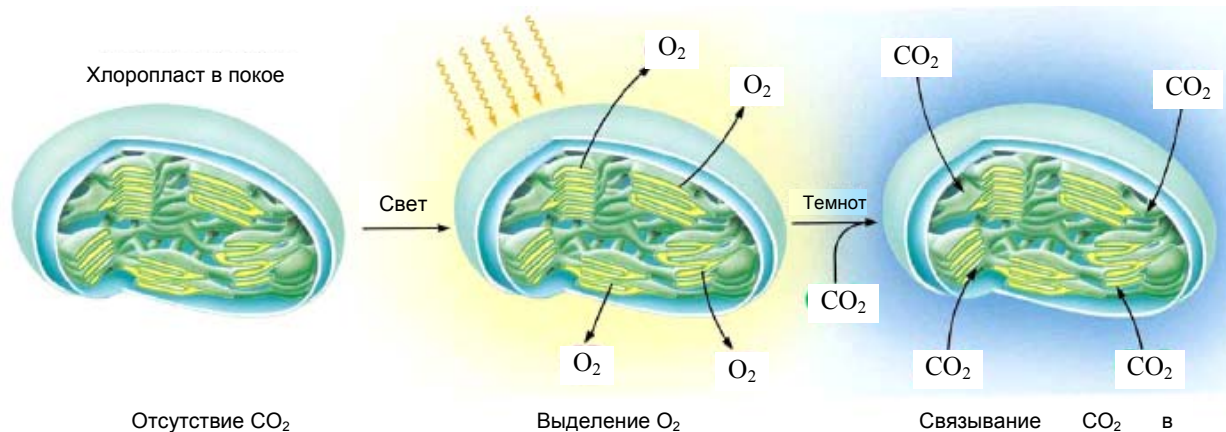


Рис. 6.8. Световая и темновая фазы фотосинтеза

В эукариотических фотосинтезирующих клетках как световые, так и темновые реакции протекают в хлоропластах, которые можно рассматривать как главные «силовые станции» таких клеток. Следует, однако, напомнить, что в клетках зеленого листа содержатся также и митохондрии. Ночью, когда клетки не получают солнечной энергии, митохондрии генерируют необходимый им *АТФ*, используя кислород для окисления углеводов, образовавшихся в хлоропластах в дневные часы. Хлоропласты у разных растений имеют самую разнообразную форму, но, как правило, они гораздо крупнее митохондрий ([рис. 6.7](#)). Снаружи хлоропласты окружены непрерывной довольно хрупкой наружной мембраной. Внутренняя мембранная система ограничивает собой внутренний компартмент хлоропласта. В нем находится много плоских мембранных мешочков, или пузырьков, часто связанных с внутренней мембраной, – *тилакоиды*; они обычно собраны в стопки, называемые *гранами*. В тилакоидных мембранах содержатся все фотосинтетические пигменты хлоропласта и все ферменты, необходимые для первичных световых реакций. Большинство ферментов, участвующих в темновых реакциях, в которых  $\text{CO}_2$  восстанавливается до глюкозы, находится в жидкости, заполняющей внутренний компартмент хлоропласта и окружающей тилакоиды; ее называют *стромой* ([рис. 6.8](#)). У многих видов темновые реакции протекают также и в цитозоле клетки.

## 6.7. Основные классы фотосинтетических пигментов

Все фотосинтетические пигменты относятся к двум химическим классам соединений:

1. Пигменты, в основе которых лежит тетрапиррольная структура (*хлорофиллы*, *фикобилипротеины*);
2. Пигменты, основу которых составляют длинные полиизопреноидные цепи (*каротиноиды*).

Хлорофиллы – это главные светопоглощающие пигменты тилакоидных мембран. В молекуле хлорофилла *a*, присутствующего в хлоропластах всех

клеток зеленых растений, содержатся четыре замещенных пиррольных кольца, из которых одно (кольцо IV) находится в восстановленной форме (рис. 6.9). Имеется еще и пятое, непиррольное, кольцо. Эту характерную структуру из пяти колец, представляющую собой производное порфирина, называют феопорфирином (от греч. *pheo* – бурый). Длинная изопреноидная боковая цепь в молекуле хлорофилла *a* представляет собой остаток спирта фитола, присоединенный сложноэфирной связью к карбоксильной группе заместителя в кольце IV (рис. 6.9). Четыре центральных атома азота в молекуле хлорофилла *a* координационно связаны с ионом  $Mg^{2+}$ .

В фотосинтезирующих клетках высших растений всегда присутствуют хлорофиллы двух типов: хлорофилл *a* и хлорофилл *b*, отличающийся от хлорофилла *a* тем, что вместо метильной группы при кольце II в нем содержится альдегидная группа (рис. 6.9). Хлорофиллы *a* и *b* могут быть выделены в чистом виде из экстрактов листьев хроматографическими методами. Хотя оба они окрашены в зеленый цвет, но их спектры поглощения слегка различаются (рис. 6.10). У большей части высших растений количество хлорофилла *a* примерно вдвое превышает количество хлорофилла *b*.

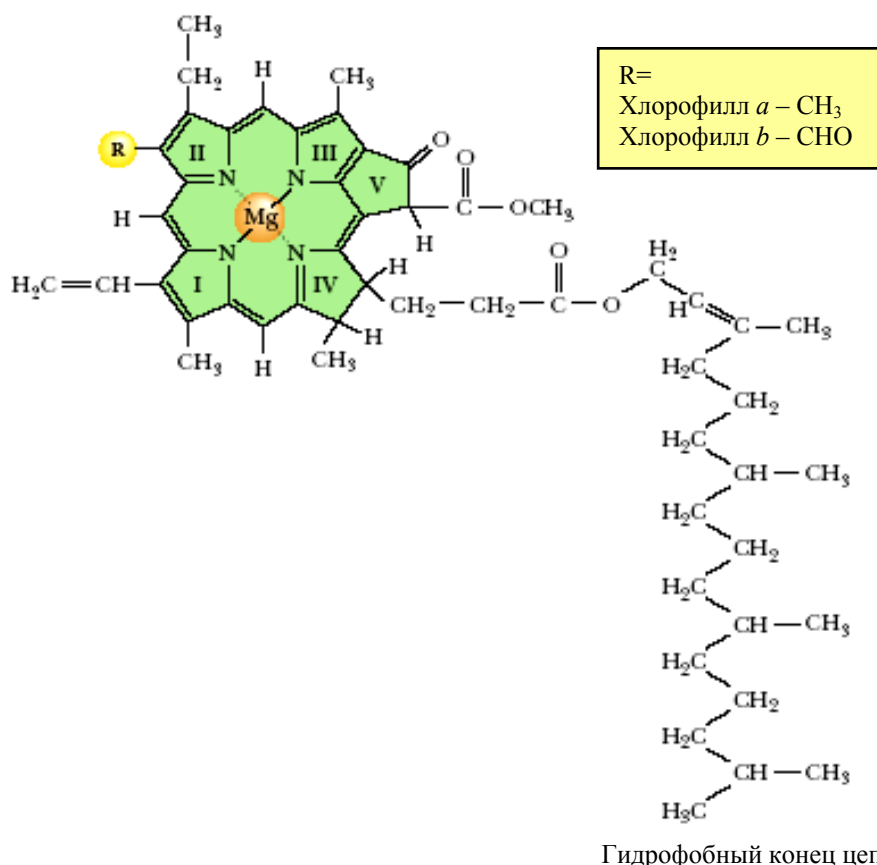


Рис. 6.9. Хлорофиллы *a* и *b* (в молекуле протопорфирина кольцо V отсутствует, *R* означает группу –  $CH_3$  в хлорофилле *a* и группу –  $CHO$  в хлорофилле *b*)

Хлорофилл имеет две функции – поглощение и передачу энергии. Структура хлорофилла тонко приспособлена к выполнению его биологической функции:

- Система из пяти колец (выделенная на рисунке зеленым цветом), которая сама образует кольцо больших размеров вокруг атома Mg, придает молекуле способность поглощать свет.
- Атом Mg способствует образованию агрегатов молекул хлорофилла, что облегчает улавливание света. Магний обладает наименьшим окислительно-восстановительным потенциалом и поэтому обладает наименьшей способностью удерживать электроны (восстановительная способность).
- Длинная гидрофобная боковая цепь служит не только для закрепления молекул хлорофилла в липидном бислое мембран, но и для придания им определенной ориентации. Фитол в поглощении света не участвует, но влияет на этот процесс, меняя ориентацию порфиринового ядра хлорофилла.

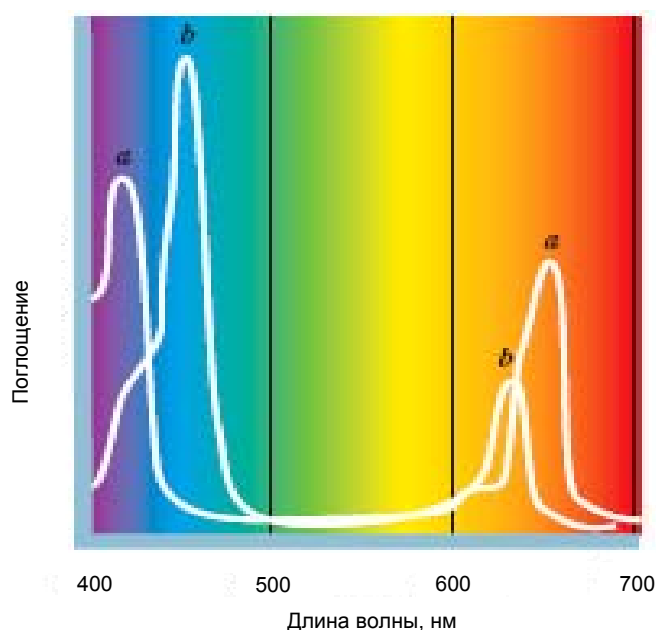


Рис. 6.10. Спектры поглощения хлорофиллов *a* и *b*

Кроме хлорофилла встречаются также и некоторые второстепенные светопоглощающие пигменты; их называют *вспомогательными*. К вспомогательным пигментам относятся различные *каротиноиды*, окрашенные в желтый, красный или пурпурный цвет и *фикобилины* – красные и синие пигменты, содержащиеся только у водорослей и одной группы эубактерий – цианобактерий ([рис. 6.11](#)).

В основе структуры каротиноидов лежит полиизопреновая ненасыщенная цепь, содержащая около 40 атомов углерода. Каротиноиды представляют группу пигментов, имеющих максимум поглощения 400–550

нм. Класс каротиноидов насчитывает более 100 представителей, которые различаются по 4 основным признакам:

1. По структуре концевых групп молекулы. У некоторых каротиноидов полиизопреноидная цепь открыта и не содержит циклических группировок. Такие каротиноиды называются алифатическими. У большинства на одном или обоих концах цепи расположено по ароматическому кольцу. Каротиноиды первого типа относятся к арильным, второго – к алициклическим.

2. По содержанию кислорода. Каротиноиды, не содержащие кислорода, называются каротинами, а кислородсодержащие – ксантофиллами. Существуют  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -каротины, а ксантофиллы подразделяются на лютеин и зеаксантин, виолаксантин и нексантин.

3. По пространственной конфигурации молекул (цис-, транс-изомеры).

4. По числу двойных связей в молекуле (при увеличении числа двойных связей максимум поглощения смещается в длинноволновую область (красную)).

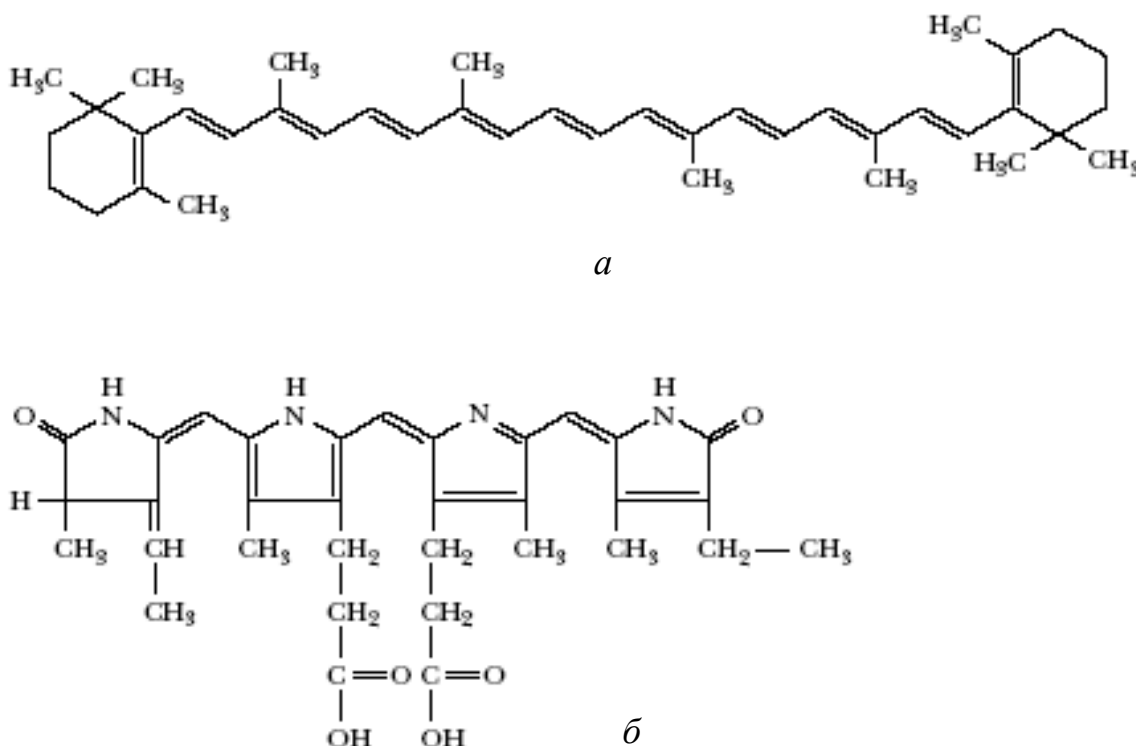


Рис. 6.11. Структуры представителей вспомогательных пигментов:

*a* –  $\beta$ -каротин; *б* – фикоцианин

Главная функция каротиноидов – антенная. Каротиноиды поглощают свет в ином диапазоне длин волн, нежели хлорофиллы; поэтому они функционируют как световые рецепторы, дополняющие хлорофиллы. Каротиноиды преимущественно поглощают свет в зеленой области спектра, где хлорофилл имеет слабое поглощение, но благодаря хорошему

перекрыванию спектров поглощения каротиноидов и спектров поглощения хлорофиллов всего видимого диапазона оптического излучения между ними осуществляется эффективная миграция энергии. Относительное содержание хлорофиллов и различных каротиноидов у разных видов растений заметно варьирует.

$\beta$ -каротин – вспомогательный пигмент зеленых листьев. У различных видов растений вспомогательными пигментами служат многие другие каротиноиды. Обратите внимание, что молекула  $\beta$ -каротина (рис. 6.11) так же, как и молекула хлорофилла, содержит много сопряженных двойных связей, которые придают ей способность поглощать свет и передавать экситоны.

*Фикобилины* – тетрапиррольные пигменты с открытой цепью. Хромофорная группа пигмента, называемая фикобилином, ковалентно связана с водорастворимым белком типа глобулина и представляет собой структуру, состоящую из четырех пиррольных колец, но не замкнутых, как в молекуле хлорофилла, а имеющих вид развернутой цепи, не содержащей металла. Молекулы фикобилипротеинов состоят из двух нековалентно связанных неидентичных субъединиц – *a* и *b*, к каждой из которых ковалентно присоединены хромофорные группы: фикоэритробилин или фикоцианобилин. Таким образом, в отличие от хлорофиллов и каротиноидов фикобилины представляют собой макромолекулы – хромопротеиды (фикобилипротеины), состоящие из специфических белков и прочно связанных с ними ковалентными связями хромофорных групп. В водорослях фикобилины находятся в специальных структурах – фикобилисомах, которые выполняют функции светособирающего комплекса. Фикоцианин – голубой пигмент цианобактерий, структура которого представляет собой незамкнутую тетрапиррольную цепь (рис. 6.11).

Именно от соотношения перечисленных пигментов зависит характерная окраска фотосинтезирующих клеток, изменяющаяся от сине-зеленой, как у хвоинок ели, или ярко-зеленой, как у листьев клена, до красной, бурой и даже пурпурной, как у разных видов многоклеточных водорослей и листьев некоторых декоративных растений. Большой арсенал дополнительных пигментов, перекрывающих своим поглощением практически весь видимый и часть ближнего инфракрасного спектра, позволяет фотосинтетикам активно улавливать падающую на Землю световую радиацию.

## 6.8. Строение фотосинтетического аппарата

Светопоглощающие пигменты собраны в функциональные наборы, или ансамбли, называемые *фотосистемами*. Все пигментные молекулы данной фотосистемы поглощают фотоны, но только одна молекула в каждом ансамбле обладает способностью превращать световую энергию в химическую. Эта специализированная трансформирующая энергию

пигментная молекула, представляющая собой молекулу хлорофилла, соединенную с особым белком, называется *фотохимическим реакционным центром* (РЦ). Все прочие пигментные молекулы в такой фотосистеме называются светособирающими или антенными молекулами. Их функция заключается в поглощении световой энергии. Эту энергию они затем очень быстро передают отдельным реакционным центрам, в которых и происходит фотохимический акт ([рис. 6.12](#)).

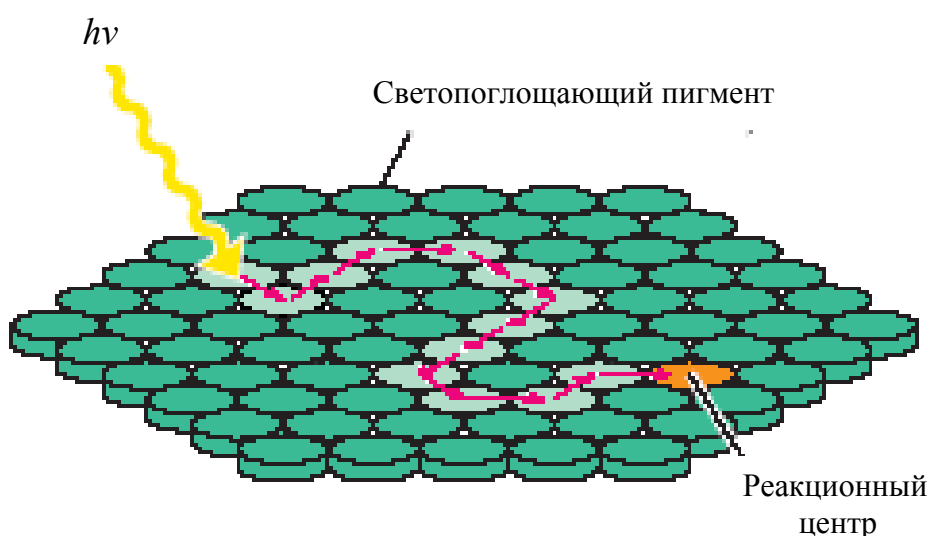


Рис. 6.12. Схема миграции энергии возбуждения (экситона) по пигментной матрице светособирающей антенны к фотореакционному центру

Любой фотосинтетический аппарат состоит из трех основных компонентов:

- 1) светособирающих пигментов, поглощающих энергию света и передающих ее в реакционные центры;
- 2) фотохимических реакционных центров, где происходит трансформация электромагнитной формы энергии в химическую;
- 3) фотосинтетических электронтранспортных систем, обеспечивающих перенос электронов, сопряженный с запасанием энергии в молекулах *АТР*, *NAD PH*.

## 6.9. Типы фотосистем

В тилакоидных мембранах хлоропластов высших растений содержатся фотосистемы двух типов, каждая со своим набором светособирающих молекул хлорофиллов и каротиноидов и со своим фотохимическим реакционным центром. *Фотосистема I*, которая максимально активируется более длинноволновой частью спектра, характеризуется высоким отношением хлорофилла *a* к хлорофиллу *b*. *Фотосистема II*, максимально активируемая светом с длинами волн короче 680 нм, содержит относительно



больше хлорофилла *b*, а иногда также хлорофилл *c*. В тилакоидных мембранах одного хлоропласта высших растений имеется много сотен фотосистем того и другого типа. Эти две фотосистемы выполняют разные функции. У фотосинтезирующих бактерий, не выделяющих кислород, имеется только фотосистема I.

Работа фотосистем начинается с того, что в молекулах пигмента квант света возбуждает один из электронов, время жизни возбужденного состояния 5 нс. Возможные пути дальнейшего преобразования энергии электрона показаны на [рис. 6.13](#): диссипация энергии в виде теплового излучения; флуоресцентное излучение; перенос энергии на соседнюю молекулу пигмента (которая, в свою очередь, переходит в возбужденное состояние) и преобразование световой энергии возбуждения в химическую энергию.

Как и в дыхательной цепи, в световых реакциях электроны переносятся по *электронтранспортной цепи* от одной окислительно-восстановительной системы к другой. Однако по сравнению с дыхательной цепью в этом случае электроны движутся в *противоположном направлении*. В дыхательной цепи электроны переносятся с *NADH* на  $O_2$  с образованием воды и выделением энергии, а при фотосинтезе электроны переносятся с воды на *NADP<sup>+</sup>* при затрате энергии. Таким образом, фотосинтетический перенос электронов в энергетическом отношении подобен «подъему в гору». В обеих фотосистемах возбуждение электронов происходит за счет энергии поглощенного света.

## 6.10. Общая схема фотосинтетического потока электронов

Итак, набор светособирающих, или антенных, пигментов с его реакционным центром, поставляющим высокоэнергетические электроны для восстановления *NADP<sup>+</sup>*, образует фотосистему I, максимально возбуждаемую светом с длиной волны 700 нм. Найдено, однако, что максимальная скорость выделения кислорода достигается лишь в том случае, если хлоропласты поглощают не только свет с длиной волны 700 нм, но и более коротковолновый свет, например с длиной волны 600 нм. Если же освещать их одним только светом с длиной волны 700 нм (без освещения светом при 600 нм), то наблюдается резкое падение скорости выделения кислорода, называемое *красным падением*, потому что 700 нм – это конец красной области спектра ([рис. 6.14](#)). Из этих наблюдений был сделан вывод, что есть две фотосистемы с максимумами поглощения при разных длинах волн и что эти фотосистемы функционируют совместно в световых реакциях фотосинтеза растений, от которых зависит выделение кислорода.

Перенос электронов от  $H_2O$  к *NADP<sup>+</sup>* происходит в результате взаимодействия фотосистем I и II. Номера фотосистем отражают порядок, в котором эти процессы были открыты, и это одна из забавных научных странностей, поскольку в листе сначала происходят реакции в фотосистеме II и лишь затем – в фотосистеме I.

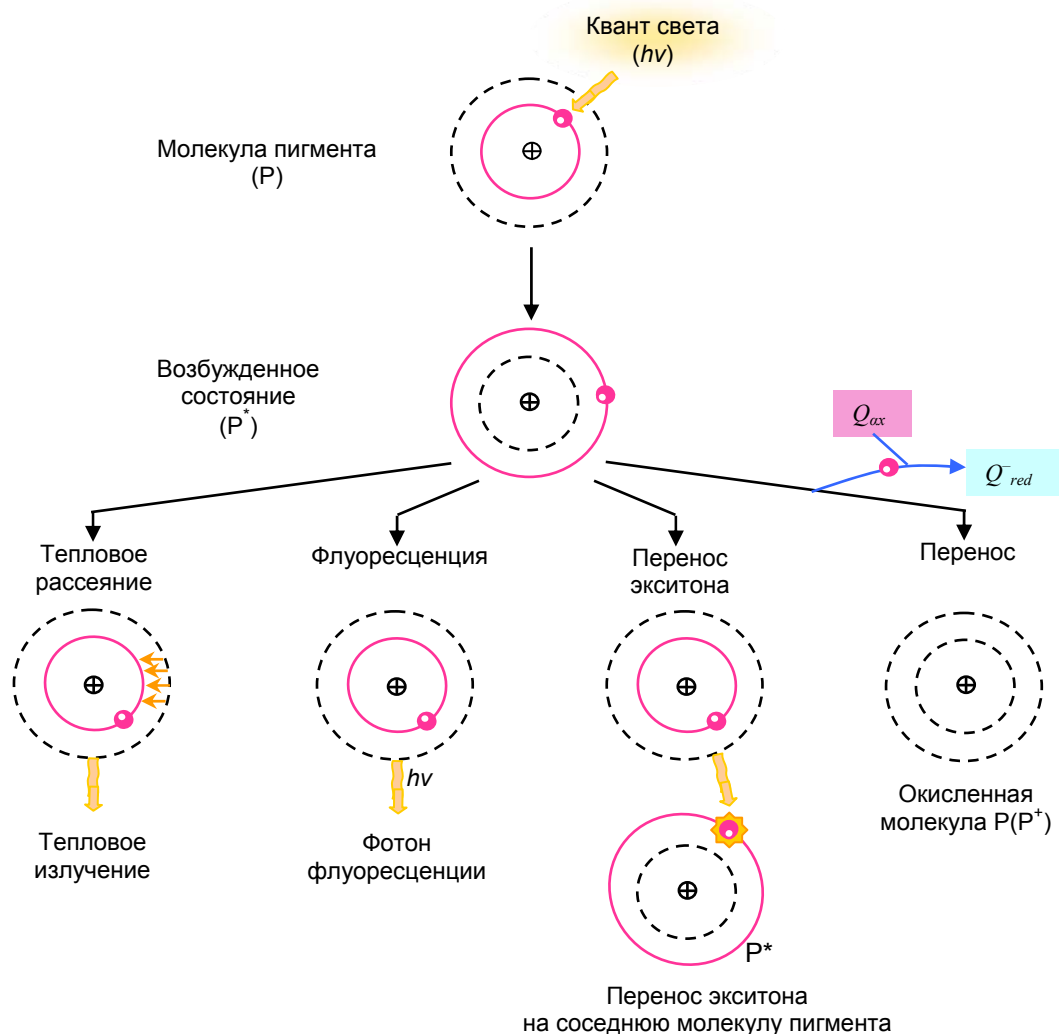


Рис. 6.13. Возможные пути преобразования световой энергии, поглощенной фотосинтетическими пигментами

На [рис. 6.15](#) приведена схема (ее часто называют Z-схемой от англ. *zigzag* – зигзаг), позволяющая проследить путь потока электронов между фотосистемами I и II, а также энергетические взаимоотношения этих двух фотосистем в световых реакциях. Эта зигзагообразная схема показывает совместное действие фотосистем I, II и компонента транспортной цепи – комплекса цитохрома *b/f* (агрегат интегральных мембранных белков, содержащий два цитохрома *b6* и *f*), а также путь потока электронов от  $H_2O$  (слева внизу) к  $NAD P^+$  (справа вверху) в нециклическом фотосинтезе растений. Кроме того, Z-схема показывает энергетические взаимоотношения. Для того чтобы электроны, происходящие из молекул  $H_2O$ , оказались на энергетическом уровне, на котором они смогут восстановить  $NAD P^+$  в  $NAD PH$ , каждый из них должен быть дважды «подброшен вверх» (жирные стрелки) фотонами, поглощенными фотосистемой I и фотосистемой II. В каждой фотосистеме на один «подброшенный вверх» электрон расходуется один квант, или фотон. После каждого из таких «подбрасываний» электроны с избыточной энергией устремляются «вниз» (стрелки на [рис. 6.15](#)) по указанным путям.

Проследим сначала путь потока электронов. Движущей силой этого потока служит свет. Когда кванты света поглощаются фотосистемой I, богатые энергией электроны выбрасываются из реакционного центра и по цепи переносчиков электронов передаются на  $NAD P^+$ , восстанавливая его в  $NAD PH$ . В результате такого процесса в фотосистеме I возникает дырка. Эта дырка заполняется затем электроном, выбрасываемым фотосистемой II при ее освещении; он попадает в фотосистему I по цепи переносчиков, связывающей фотосистему II с фотосистемой I. Это, однако, приводит к возникновению дырки в фотосистеме II. Она, в свою очередь, заполняется электроном, поступающим от  $H_2O$ . Расщепляясь, молекула воды дает: 1) электроны, заполняющие дырки в фотосистеме II; 2)  $H^+$  – ионы, поступающие в среду; 3) молекулярный кислород, выделяемый в газовую фазу (рис. 6.15). Уравнение для расщепления воды имеет вид

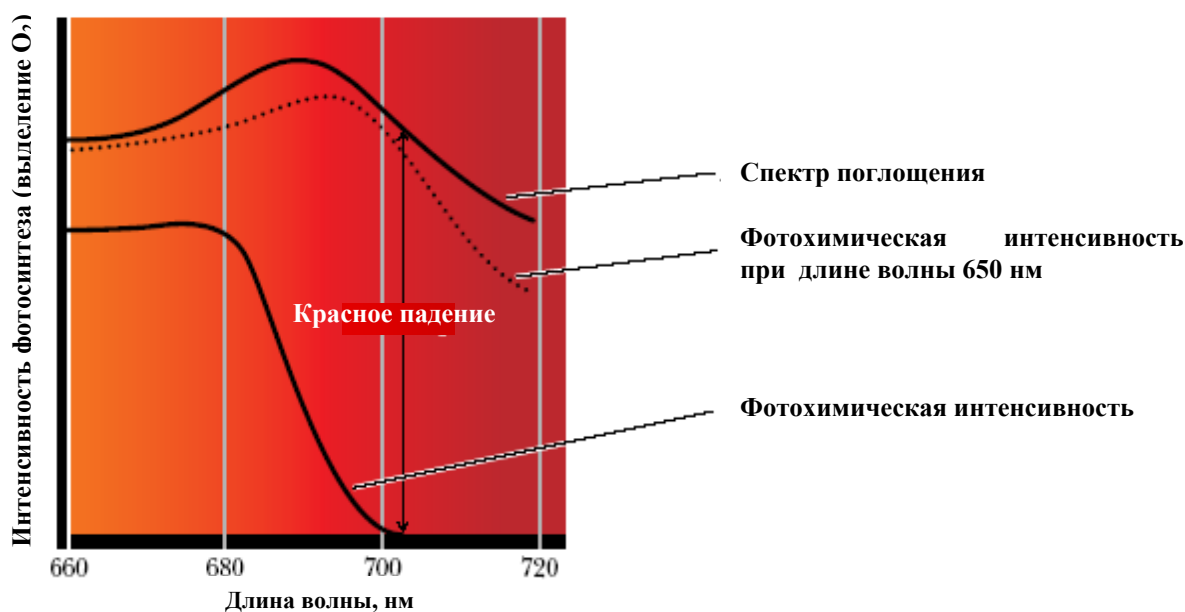


Рис. 6.14. Эффект красного падения

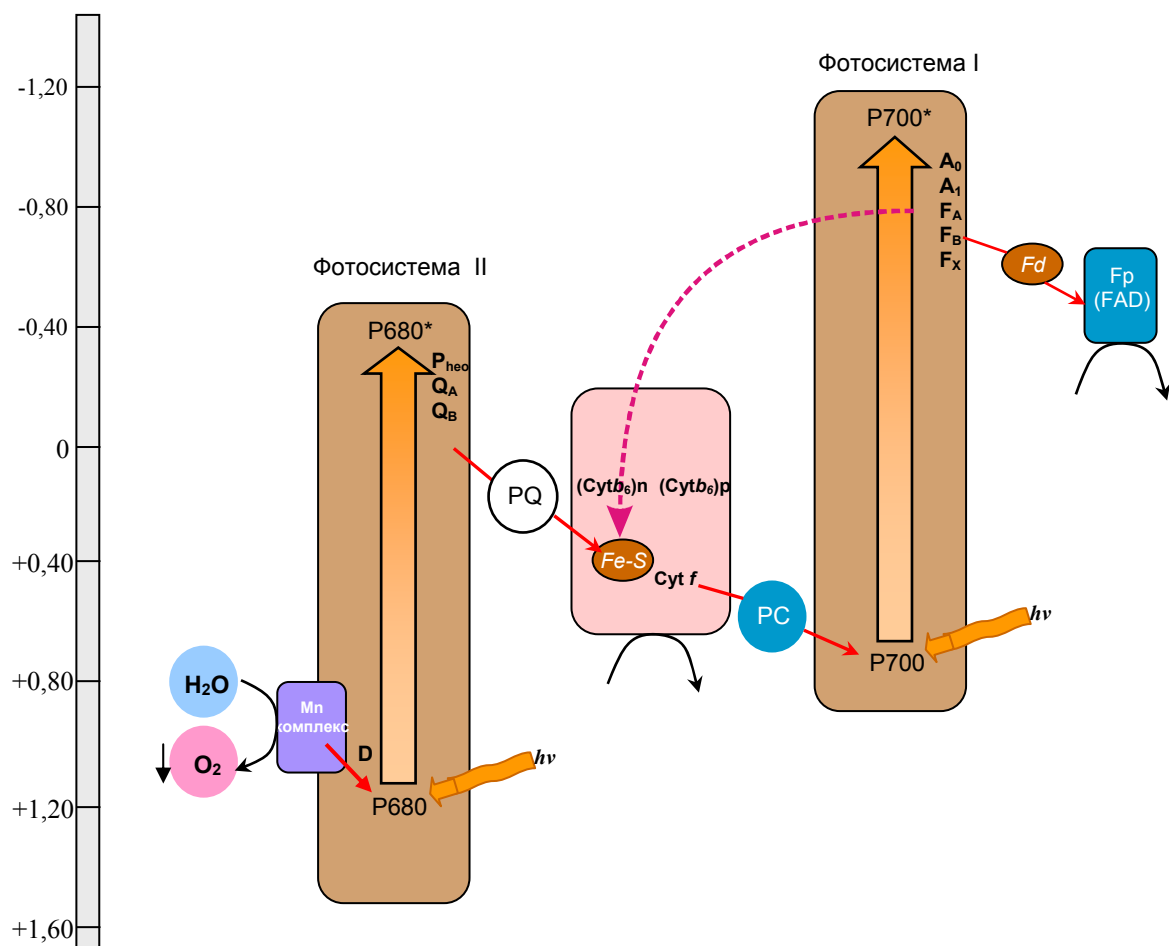


Рис. 6.15. Z-схема фотосинтеза

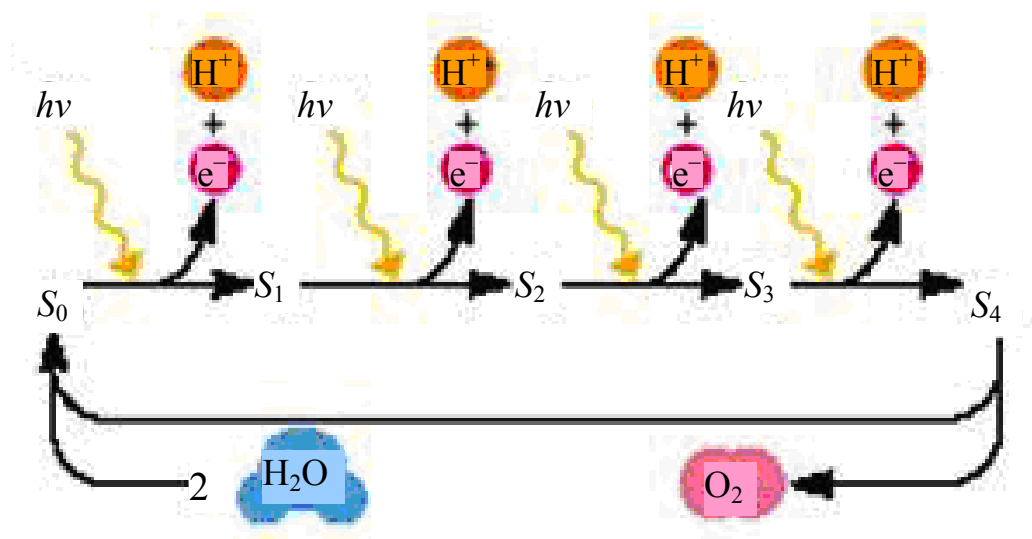
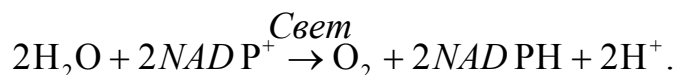


Рис. 6.16. Процесс образования кислорода

Z-схема, таким образом, описывает весь путь, по которому электроны переходят от  $H_2O$  к  $NAD P^+$ , согласно уравнению



На каждый электрон, переходящий от  $H_2O$  к  $NAD P^+$ , поглощаются два кванта света, по одному на каждую фотосистему. Для образования одной молекулы  $O_2$  от  $H_2O$  к  $NAD P^+$  должны быть переданы четыре электрона, т. е. должно быть поглощено восемь квантов – по четыре на каждую фотосистему (рис. 6.16).

### 6.11. Функциональные взаимодействия компонентов фотосинтетического аппарата

Процессы, при которых электроны переносятся «вверх», требуют затраты световой энергии, а процессы, при которых электроны движутся «вниз», сопровождаются уменьшением свободной энергии. При поглощении кванта света фотосистемой I один из ее электронов переходит из состояния с относительно низкой энергией в состояние, богатое энергией, вследствие чего фотохимический реакционный центр фотосистемы I, находящийся теперь в возбужденном состоянии, становится очень мощным восстановителем, так что электроны движутся от него «вниз» к  $NAD P^+$  и восстанавливают его в  $NAD PH$ . Высокоэнергетические электроны, движущиеся от фотосистемы II к фотосистеме I, также получили энергию от квантов света, но от тех, которые были поглощены фотосистемой II. Дырки в фотосистеме II, ставшей теперь очень мощным окислителем (акцептором электронов), заполняются электронами, которые движутся «вниз» от  $H_2O$  (рис. 6.17). Z-схема, следовательно, показывает тот путь, по которому электроны переходят от  $H_2O$  к  $NAD P^+$ , восстанавливая его в  $NAD PH$ , т. е. путь от большого положительного стандартного потенциала (+0,82 В) к большому отрицательному (–0,32 В) (рис. 6.18). Свободную энергию, необходимую для переноса одного электрона от  $H_2O$  к  $NAD P^+$ , поставляют два поглощенных кванта света; один из них поглощается фотосистемой I, а другой – фотосистемой II.

Обратите внимание, что акцепторы электронов  $QA$  в фотосистеме II (рис. 6.17) и  $A1$  в фотосистеме I располагаются в стромах, тогда как доноры электронов  $P_{680}$  и  $P_{700}$  – в люменах. Протоны, перемещающиеся из люмена, создают хемиосмотический градиент, который является движущей силой для синтеза  $ATP$   $CF_1CF_0$   $ATP$ -синтетазой. В состав фотосистемы II входят: фотореакционный центр  $P_{680}$ , первичный акцептор – феофитин ( $Pheo$ ), вторичные акцепторы – молекулы пластохинона ( $QA$  и  $QB$ ) и водорасщепляющий комплекс. В состав фотосистемы I входят: первичный

акцептор электрона РЦ – молекула хлорофилла *a* (*A0*), вторичные акцепторы РЦ – молекула филлохинона (*A1*) и три переносчика белковой природы (ферредоксины *FeSX*, *FeSA*, *FeSB*), у которых в активном центре находятся атомы железа и серы. В переносе электрона от акцепторов фотосистемы I к  $NAD P^+$  участвуют растворенный в строме белок ферредоксин (*Fd*) и связанный с мембраной специальный электронтранспортный комплекс ферредоксин- $NAD P$ -редуктаза, функционирующие на внешней стороне тилакоидной мембраны. При восстановлении одной молекулы  $NAD P^+$  до  $NAD PH$  на нее переносятся два электрона и один ион водорода, который захватывается из стромы.

Реально фотосинтетический перенос электронов у растений начинается с фотосистемы II. Фотосистема II состоит из множества белковых субъединиц, которые содержат связанные пигменты, т. е. молекулы красителей, участвующие в поглощении и передаче энергии света. На схеме приведены лишь наиболее важные пигменты, в числе которых специальный светопоглощающий хлорофилл (реакционный центр  $P_{680}$ ). Соседний феофитин (хлорофилл, не содержащий ионов  $Mg^{2+}$ ) и два связанных пластохинона ( $Q_A$  и  $Q_B$ ). Третий хион ( $PQ$ ) связан не с фотосистемой II, а принадлежит к пластохиноновому «пулу». Стрелки на [рис. 6.17](#) и [рис. 6.18](#) указывают направление электронного потока от молекул воды к  $PQ$ . Восстановленная форма пластохинона, в свою очередь, передает электроны цитохрому типа *b*, называемому цитохромом  $b_6$ . От него они переходят на цитохром *f* (от лат. *frons* – листья), который близок к цитохрому с митохондрий. Цитохром *f* передает электроны медьсодержащему голубому белку – пластоцианину. Истинным переносчиком электронов является атом меди этого белка, способный к обратимому изменению валентности  $Cu(I)$ – $Cu(II)$ . Пластоцианин служит непосредственным донором электронов для дырок в реакционном центре  $P_{700}$  фотосистемы I.

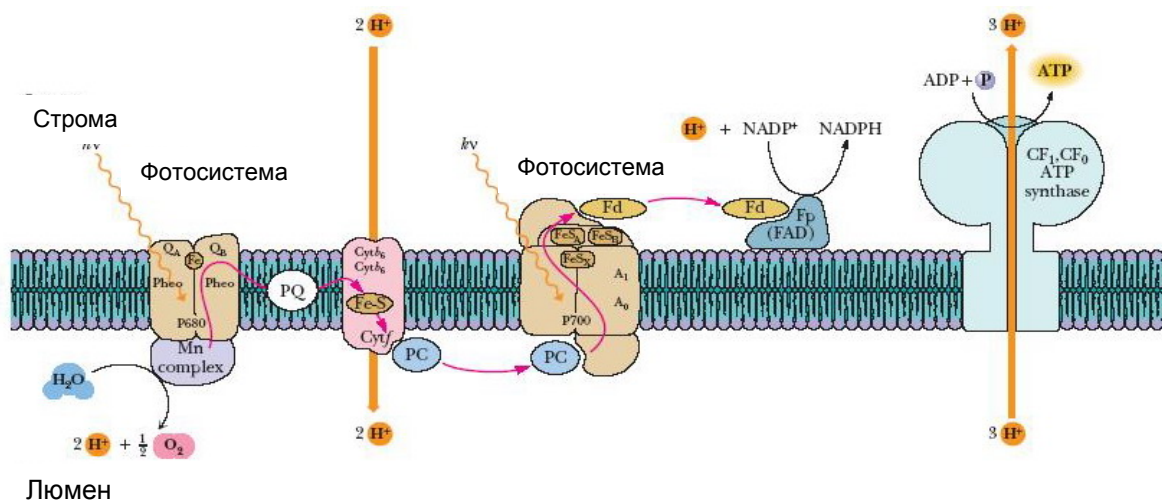


Рис. 6.17. Функциональные взаимодействия фотосистем I, II, комплекса цитохрома *b/f* и  $CF_1CF_0$   $ATP$ -синтазы в тилакоидной мембране



Дырки в реакционном центре  $P_{680}$  фотосистемы II заполняются электронами, отщепляемыми от воды  $Mn^{2+}$ -содержащим ферментным комплексом, который называется  $H_2O$ -дегидрогеназой (рис. 6.19).

Только около 1 % молекул хлорофилла в фотосистеме II непосредственно участвуют в фотохимическом переносе электронов. Основная часть связана с другими пигментами в так называемом комплексе светособирающей антенны. Энергия квантов света, накопленная в комплексе, передается в реакционный центр, где и утилизируется.

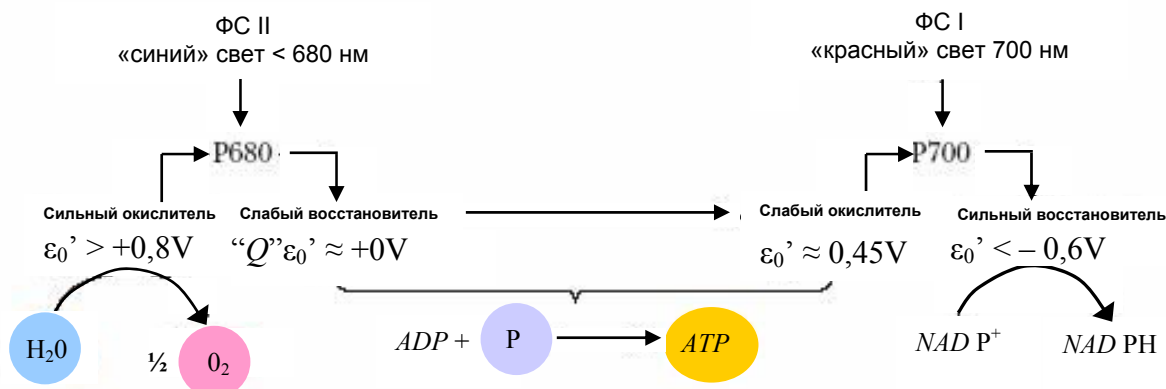


Рис. 6.18. Роли фотосистем I и II

На рис. 6.20 постадийно показан фотосинтетический электронный транспорт в фотосистеме II. Поступающая от светособирающей антенны энергия света переводит электрон реакционного центра молекулы хлорофилла в возбужденное «синглетное состояние» (a). Возбужденный электрон немедленно переносится на соседний феофитин. Вследствие этого в реакционном центре остается «электронная дыра», т. е. положительно заряженный радикал  $P_{680}$  (b). Эта дыра заполняется электроном, который отнимается от молекулы воды водорасщепляющим ферментом (b). Возбужденный электрон переносится с феофитина через  $Q_A$  на акцептор  $Q_B$ , переводя его в семихиноновый радикал (c).  $Q_B$  восстанавливается вторым возбужденным электроном до гидрохинона (d) и, наконец, обменивается на окисленный хинон ( $PQ$ ) из пластохинонового пула.

В фотосистеме I также происходит возбуждение электронов за счет энергии поглощенного света. Реакционный центр фотосистемы I – это специальный светопоглощающий хлорофилл (реакционный центр  $P_{700}$ ). Другими компонентами транспортной цепи является  $A_0$  (специализированный хлорофилл a) и  $A_1$  (специализированный хинон фотосистемы I), которые передают электрон связанным с мембраной ферридоксинам  $F_A$ ,  $F_B$  и  $F_X$  и

далее на растворимую форму ферридоксина  $F_d$ . Ферридоксин  $F_d$  выступает донором электронов для флавопротеина  $F_p$  (это так называемая ферридоксин- $NAD$  P-редуктаза), который катализирует восстановление  $NAD P^+$  до  $NAD PH$ :

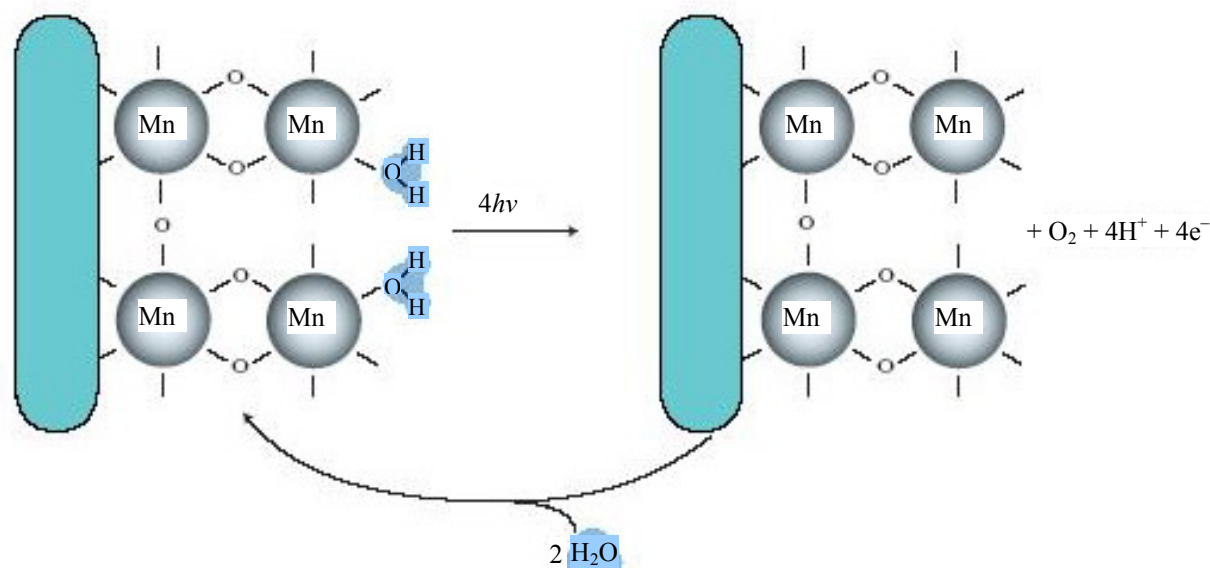
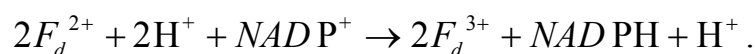


Рис. 6.19. Предполагаемое взаимодействие 4 атомов Mn в комплексе, участвующем в преобразовании 2 молекул  $H_2O$  и образовании  $O_2$

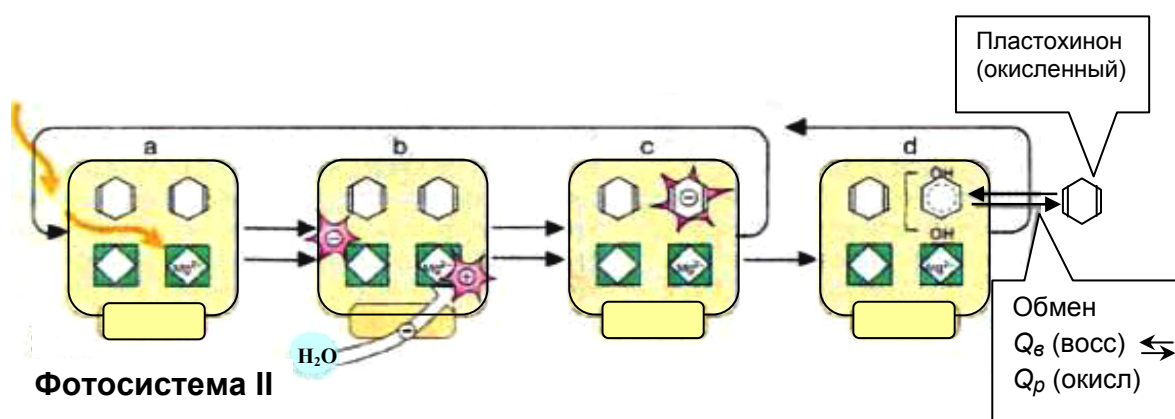


Рис. 6.20. Фотосинтетический электронный транспорт в фотосистеме II

Всю последовательность реакций, изображенных на [рис. 6.15](#), объединяют под общим названием «световые реакции» фотосинтеза. Такое определение удобно, поскольку оно вполне четко разграничивает энергогенерирующую фазу фотосинтеза и темновые реакции, обеспечивающие восстановление  $CO_2$  до глюкозы. Однако название

«световые реакции» не вполне точно. В действительности только для двух этапов этих «световых реакций» нужен свет, а именно для тех этапов, которые переводят в возбужденное состояние два фотохимических реакционных центра. После того как электроны, поглотив световую энергию, перейдут на более высокий энергетический уровень, все остальные этапы фотосинтетического переноса электронов могут уже идти и в темноте. Поэтому пользоваться термином «световые реакции» следует всегда с полным пониманием природы того процесса, о котором идет речь.

## 6.12. Механизм фотофосфорилирования

В 1954 году Даниэль Арнон со своими сотрудниками в Калифорнийском университете в Беркли обнаружил, что при фотосинтетическом переносе электронов в освещаемых хлоропластах шпината из *ADP* и фосфата синтезируется *ATP*. Одновременно и независимо от них Альберт Френкель в Университете штата Миннесота наблюдал синтез *ATP* в освещаемых хромофорах (мембранных пигментсодержащих структурах), выделенных из фотосинтезирующих бактерий. Обе группы исследователей пришли к выводу, что какая-то часть световой энергии, улавливаемой фотосинтетическими системами этих организмов, трансформируется в энергию фосфатной связи *ATP*. Этот процесс стали называть *фотосинтетическим фосфорилированием*, или *фотофосфорилированием*, в отличие от окислительного фосфорилирования, протекающего в дышащих митохондриях. Энергия высвобождается, когда богатые энергией электроны движутся по фотосинтетической цепи переноса электронов «вниз» от возбужденной фотосистемы II к дыркам фотосистемы I.

Так как фотосистема II и комплекс цитохрома *b/f* передают протоны от восстановленного пластохинона в люмен, фотосинтетический электронный транспорт формирует *электрохимический градиент*, который используется *ATP-синтазой* для образования *ATP*. Как *ATP*, так и *NADPH + H<sup>+</sup>*, необходимые для темновой реакции, образуются в строме ([рис. 6.21](#)).

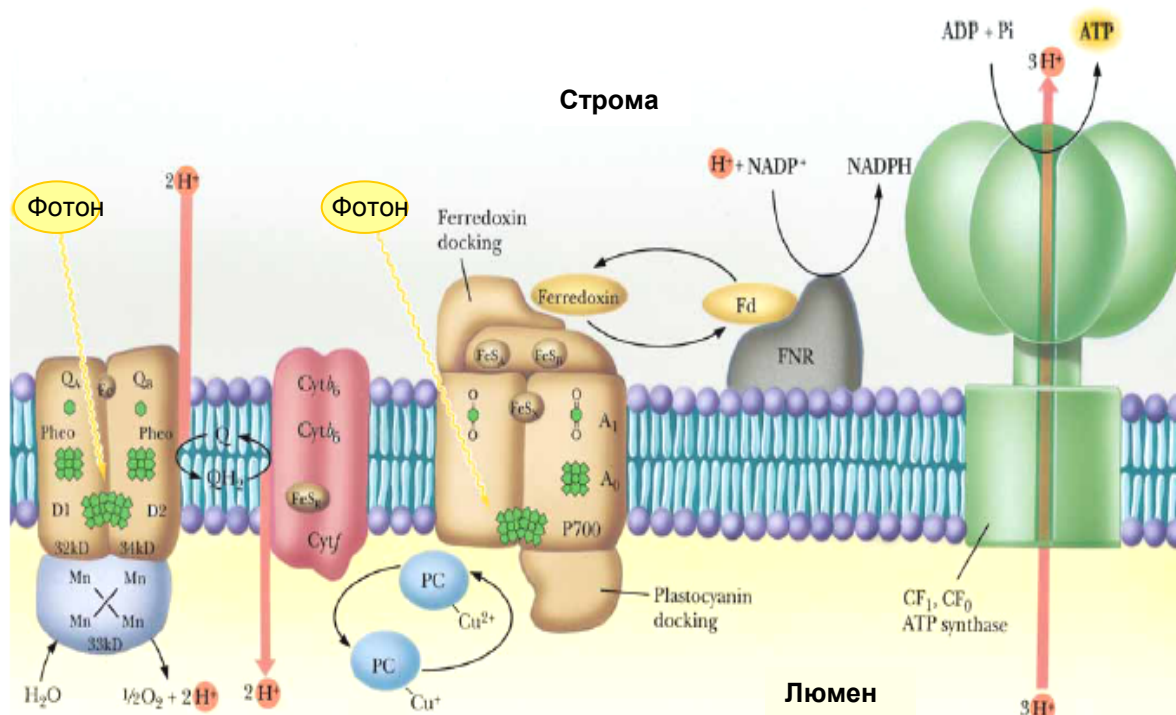


Рис. 6.21. Механизм фотофосфорилирования

Фотосинтетический перенос электронов и фотофосфорилирование в хлоропластах во многом сходны с переносом электронов и окислительным фосфорилированием в митохондриях. Это сходство проявляется в следующем: 1) реакционные центры, переносчики электронов и ферменты, участвующие в образовании *ATP*, находятся в мембране тилакоидов; 2) необходимым условием фотофосфорилирования является целостность тилакоидных мембран; 3) тилакоидная мембрана непроницаема для ионов H<sup>+</sup>; 4) фотофосфорилирование можно разобщить с переносом электронов при помощи реагентов, способных стимулировать прохождение ионов H<sup>+</sup> через тилакоидную мембрану; 5) фотофосфорилирование можно блокировать олигомицином и другими аналогичными агентами, подавляющими в митохондриях синтез *ATP* из *ADP* и фосфата, катализируемый *ATP*-синтетазой; 6) синтез *ATP* осуществляется «грибовидными» ферментными молекулами, находящимися на наружной поверхности тилакоидной мембраны; по своей структуре и функции они очень напоминают *F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP*-азу митохондрий, вследствие чего их часто обозначают символом *CF* (от англ. *chloroplast* – хлоропласт).

### 6.13. Строение АТФ-синтазы

$CF_0$   $CF_1$ -АТФ-синтаза представляет собой белковый ансамбль, который состоит из двух крупных белковых фрагментов: локализованного в мембране фактора сопряжения  $CF_0$  и выступающего наружу (в сторону стромы) белкового комплекса (фактор сопряжения  $CF_1$ ). Реакции синтеза АТФ происходят поочередно в трех  $\beta$ -субъединицах фактора сопряжения  $CF_1$ , которые вместе с тремя гомологичными им  $\alpha$ -субъединицами образуют шарообразную структуру.

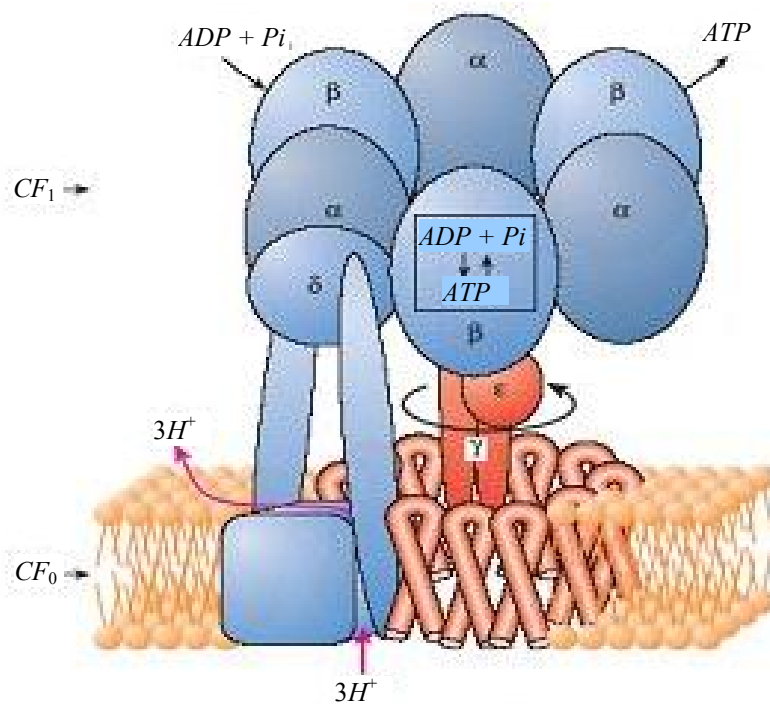


Рис. 6.22. Схема пространственного строения АТФ-синтазы и ее расположение относительно тилакоидной мембраны

В состав  $CF_1$  входят также три субъединицы меньшей молекулярной массы. Одна из них (субъединица  $\gamma$ ) имеет продолговатую форму. Эта субъединица пронизывает насквозь глобулу  $CF_1$  и выступает в сторону мембраны, проникая внутрь  $CF_0$ . Две другие минорные субъединицы ( $\delta$  и  $\epsilon$ ), как полагают некоторые исследователи, находятся в центре и на периферии фактора сопряжения  $CF_1$ . В результате работы цепи электронного транспорта концентрация протонов внутри тилакоидов возрастает. Мембранный фрагмент АТФ-синтазы ( $CF_0$ ) выполняет роль протонпроводящего канала, по которому ионы водорода из внутреннего пространства тилакоидов подводятся к определенным функциональным группам. Поток протонов через ансамбль  $CF_0$ – $CF_1$ , направленный из тилакоидов в строму, обеспечивает работу АТФ-синтазы (рис. 6.22).



## 6.14. Механизм работы АТР-синтазы

Подобно внутренней митохондриальной мембране, тилакоидная мембрана асимметрична по своему молекулярному строению ([рис. 6.23](#)). Внутренняя и наружная поверхности тилакоидной мембраны различны. Фотосистемы и цепь переноса электронов ориентированы таким образом, что они накачивают ионы  $H^+$  внутрь тилакоида. АТР-синтетазные «головки» (CF) располагаются на наружной поверхности мембраны. Молекулы переносчиков в цепи переноса электронов, ведущей от фотосистемы II к фотосистеме I, ориентированы в тилакоидной мембране таким образом, что перенос электронов создает реальный поток ионов  $H^+$  через тилакоидную мембрану, направленный снаружи внутрь. Под влиянием индуцированного светом потока электронов возникает, следовательно, трансмембранный градиент концентрации ионов  $H^+$ , так что с внутренней стороны тилакоидных пузырьков среда становится более кислой, чем с наружной. Все эти свойства согласуются с хемиосмотической гипотезой, предложенной первоначально для объяснения окислительного фосфорилирования, а позднее распространенной и на фотосинтетическое фосфорилирование.

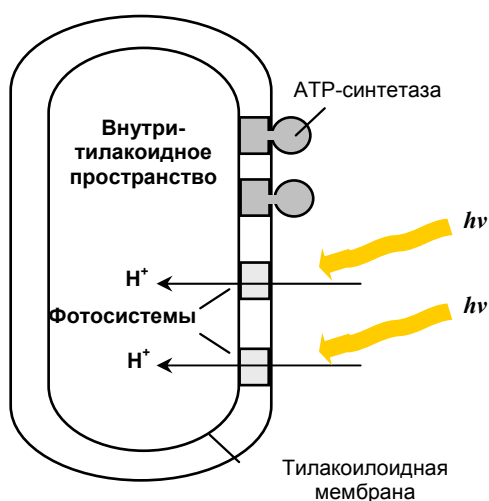


Рис. 6.23. Внутренняя и наружная поверхности тилакоидной мембраны

Схема на [рис. 6.22](#) изображает поток ионов  $H^+$ , движимых световой энергией; ионы  $H^+$  поступают из стромы внутрь тилакоида и вновь возвращаются наружу через молекулы АТР-синтазы.

В 1966 году Андрэ Ягендорф поставил важный эксперимент, доказавший, что источником энергии для синтеза АТР действительно может служить трансмембранный градиент рН, обращенный щелочным концом наружу. Сначала он инкубировал хлоропласты в темноте в буферном растворе (рН 4), который медленно проникал во внутренний компартмент тилакоидов, снижая рН их содержимого. Затем, после добавления к этой темновой суспензии хлоропластов АDP и фосфата, он быстро доводил рН



среды до 8, добавляя к ней щелочной буфер, т. е. мгновенно создавал большой трансмембранный градиент рН. Когда этот градиент начинал уменьшаться вследствие выхода ионов  $H^+$  из тилакоидов в среду, происходило образование *АТФ* из *АДР* и фосфата. Поскольку *АТФ* синтезировался в темноте, этот эксперимент доказывал, что трансмембранный градиент рН есть высокоэнергетическое состояние, посредством которого энергия переноса электронов передается *АТФ*-синтазе, получающей таким образом возможность генерировать *АТФ*, как это постулируется хемиосмотической гипотезой.

### 6.15. Циклическое фотофосфорилирование

Кроме рассмотренного выше нециклического потока электронов, направленного от  $H_2O$  к  $NAD P^+$  в хлоропластах существует еще один тип потока электронов, индуцируемого светом; его называют циклическим. В циклический поток электронов вовлекается только фотосистема I ([рис. 6.24](#)). Циклическим этот поток называется потому, что электроны, выброшенные фотосистемой I при ее освещении и присоединенные первым акцептором электронов, не переходят затем к  $NAD P^+$ , а возвращаются обходным путем в фотосистему I и заполняют в ней дырку. Фотосинтетический перенос электронов вызывает перекачивание ионов  $H^+$  из наружной среды в тилакоид, в результате чего возникает трансмембранный  $H^+$ -градиент, обращенный кислым концом внутрь. Возврат ионов  $H^+$  наружу через ориентированную *АТФ*-синтазную молекулу поставляет энергию для синтеза *АТФ* из *АДР* и фосфата.

Этот обходной путь, или шунт, включает несколько переносчиков электронов из числа тех, которые входят в цепь, соединяющую фотосистемы II и I, а также участок, соответствующий этапу фосфорилирования. Таким образом, при освещении фотосистемы I электроны могут совершать циклические переходы – покидать реакционный центр фотосистемы I и вновь возвращаться в него.

Энергия, необходимая для проведения одного электрона через такой цикл, обеспечивается поглощением одного кванта света. Циклический поток электронов не сопровождается реальным образованием  $NAD PH$  и выделением кислорода, однако ему сопутствует фосфорилирование *АДР* до *АТФ* – так называемое циклическое фотофосфорилирование ([рис. 6.25](#)). Суммарное уравнение для циклического потока электронов и фотофосфорилирования имеет простой вид:



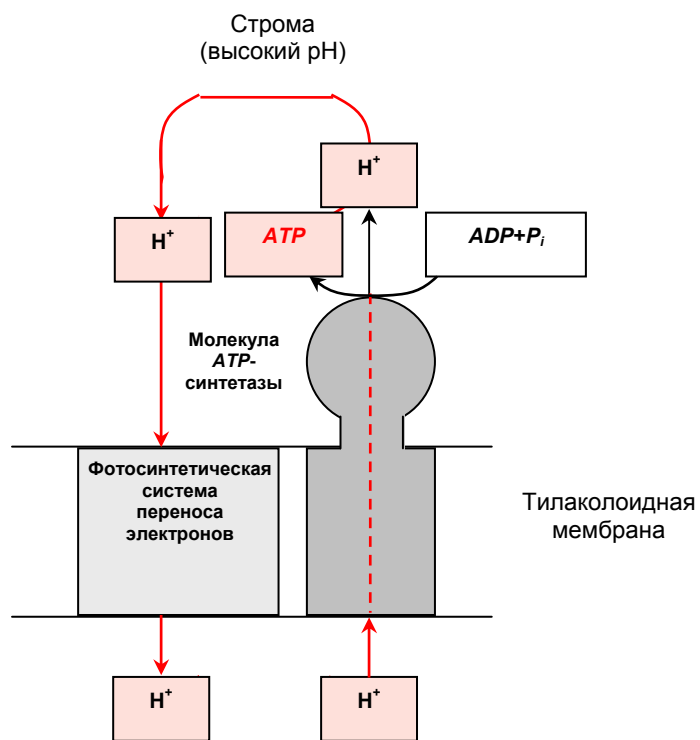


Рис. 6.24. Фотосинтетический  $H^+$ -цикл

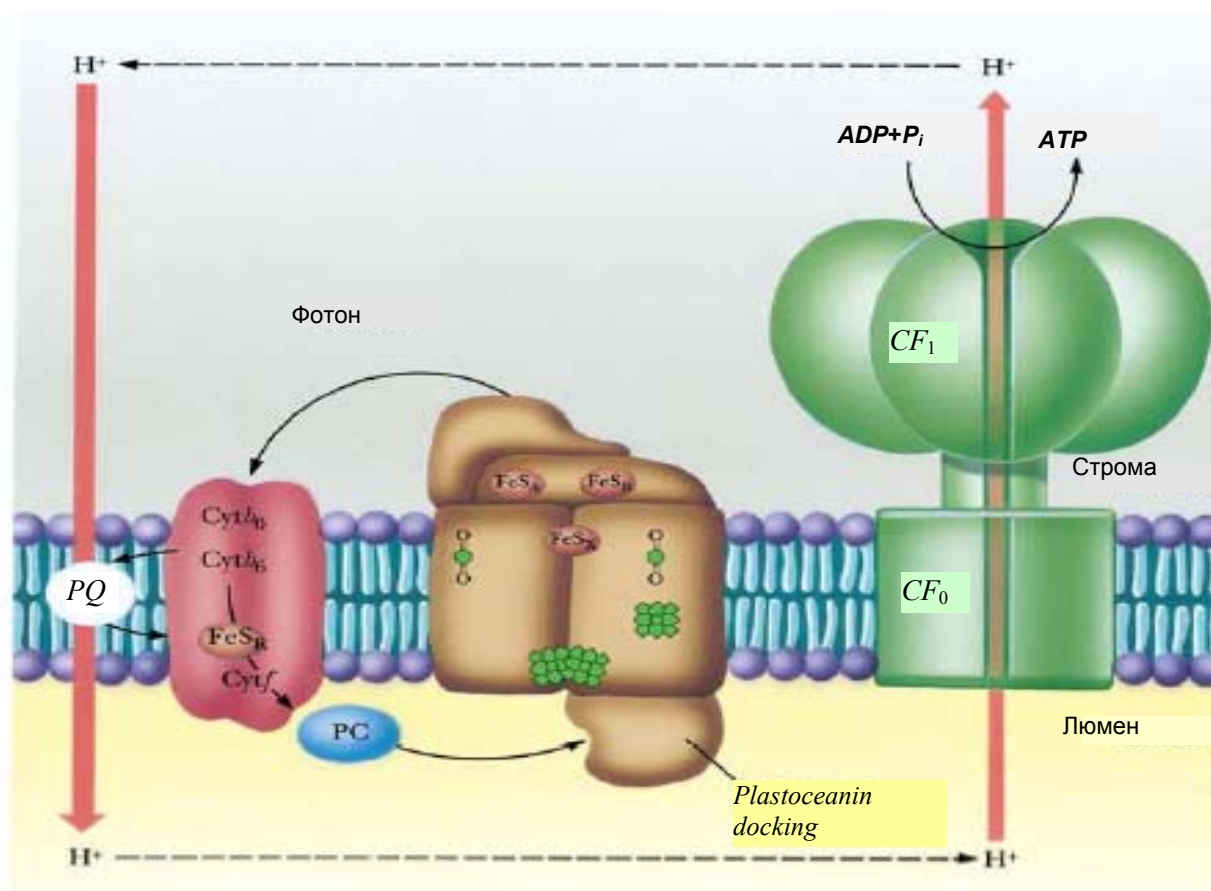


Рис. 6.25. Путь электронов при циклическом фотофосфорилировании

При циклическом фотофосфорилировании участвует только фотосистема I: электроны возвращаются по обходному пути к фотосистеме I вместо того, чтобы восстанавливать  $NAD P^+$  в  $NAD PH$ . Предполагается, что циклический поток электронов и фотофосфорилирование включаются в растительной клетке тогда, когда она вполне обеспечена восстановительной силой в форме  $NAD PH$ , но при этом испытывает потребность в дополнительном количестве  $ATP$  для других метаболических нужд.

Итак, можно выделить основные этапы преобразования энергии, приводящие к образованию  $ATP$  и  $NAD PH$ :

1. Поглощение света пигментами светособирающей антенны.
2. Перенос энергии возбуждения к фотореакционному центру.
3. Окисление фотореакционного центра и стабилизация разделенных зарядов.
4. Перенос электрона по цепи электронного транспорта, образование  $NAD PH$ .
5. Трансмембранный перенос ионов водорода.
6. Синтез  $ATP$ .

## 6.16. Синтез углеводов в фотосинтезирующих организмах. Цикл Кальвина

### 6.16.1. Различия между фотосинтезирующими организмами и гетеротрофами.

После того как солнечная энергия поглощена и запасена, наступает очередь образования углеводов. Здесь мы сталкиваемся с существенным различием между фотосинтезирующими организмами и гетеротрофами. Зеленым растениям и фотосинтезирующим бактериям двуокись углерода может служить единственным источником всех углеродных атомов, какие требуются им не только для биосинтеза целлюлозы или крахмала, но и для образования липидов, белков и многих других органических компонентов клетки. В отличие от них животные и вообще все гетеротрофные организмы не способны осуществлять реальное восстановление  $CO_2$  и образовывать таким образом «новую» глюкозу в сколько-нибудь заметных количествах. Интересно, что путь синтеза глюкозы сам по себе не требует света – составляющие его реакции протекают в темновой фазе фотосинтеза.

### 6.16.2. История открытия цикла синтеза глюкозы.

Основной механизм синтеза углеводов в растениях был открыт Мелвином Кальвином ([рис. 6.26](#)), проделавшим в 1940-е годы серию экспериментов, ставших уже классическими. Исследователи освещали суспензию зеленых водорослей в течение всего нескольких секунд в присутствии радиоактивной двуокиси углерода ( $^{14}CO_2$ ), а затем быстро убивали клетки, экстрагировали их и хроматографическими методами

определяли, в каких метаболитах радиоактивный углерод появлялся раньше всего. Первым соединением, включившим метку, оказался 3-фосфоглицерат, один из промежуточных продуктов гликолиза. Расщепление этого соединения показало, что радиоактивный углерод сосредоточен, главным образом, в карбоксильной группе. Это было очень важным открытием, потому что в животных тканях в присутствии радиоактивной  $\text{CO}_2$  не наблюдается быстрого включения метки в углерод карбоксильной группы.



Рис. 6.26. Американский биолог Мелвин Кальвин (1911–1997)

Полученные результаты, следовательно, давали все основания считать, что 3-фосфоглицерат является одним из первых промежуточных продуктов фотосинтеза. В пользу этого говорил и тот факт, что 3-фосфоглицерат быстро превращается в глюкозу в растительных экстрактах.

### 6.16.3. Цикл Кальвина.

Дальнейшие исследования позволили выявить в экстрактах из зеленых листьев фермент, ответственный за переход  $^{14}\text{CO}_2$  в органическую форму. Им оказалась рибулозодифосфаткарбоксилаза, катализирующая ковалентное включение  $\text{CO}_2$  и одновременное расщепление пятиуглеродного сахара рибулозо-1,5-дифосфата с образованием двух молекул 3-фосфоглицерата, из которых одна несет в своей карбоксильной группе радиоактивный углерод, включенный в виде  $\text{CO}_2$  (рис. 6.27). Этот фермент, не встречающийся в животных тканях, имеет очень сложное строение (рис. 6.28) и молекулярную массу 550000; локализуется он на наружной поверхности тилакоидной мембраны. Молекула фермента состоит из восьми больших, или каталитических, субъединиц ( $L$ ) и восьми малых, или регуляторных, ( $S$ ). На долю его приходится около 15 % всего белка хлоропластов. Рибулозодифосфаткарбоксилаза – самый распространенный фермент в

биосфере. Это главный фермент, ответственный за образование биомассы из  $\text{CO}_2$  в растительном мире. 3-фосфоглицерат, образовавшийся под действием рибулозодифосфаткарбоксилазы, может затем превращаться в глюкозо-6-фосфат путем обращения гликолитических реакций с использованием «обходной» фруктозодифосфатазной реакции, точно так же, как это происходит в животных тканях. Фиксированная  $\text{CO}_2$  обнаруживается в виде карбоксильной группы одной из двух молекул 3-фосфоглицерата, образующихся в реакции катализируемой рибулозодифосфаткарбоксилазой.

Кальвин с сотрудниками постулировали существование сложного циклического механизма, обеспечивающего полный биосинтез глюкозы, т. е. образование всех ее шести углеродных атомов из двуокиси углерода (рис. 6.29 и рис. 6.30).

В цикле Кальвина на каждую фиксированную молекулу  $\text{CO}_2$  потребляется одна молекула рибулозо-1,5-дифосфата, которая, однако, регенерирует в конце цикла.

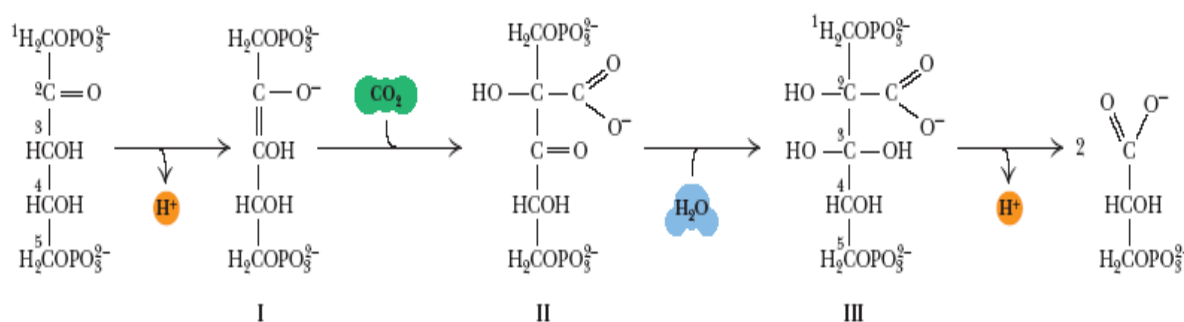


Рис. 6.27. Фиксация двуокиси углерода в реакции, катализируемой рибулозодифосфаткарбоксилазой

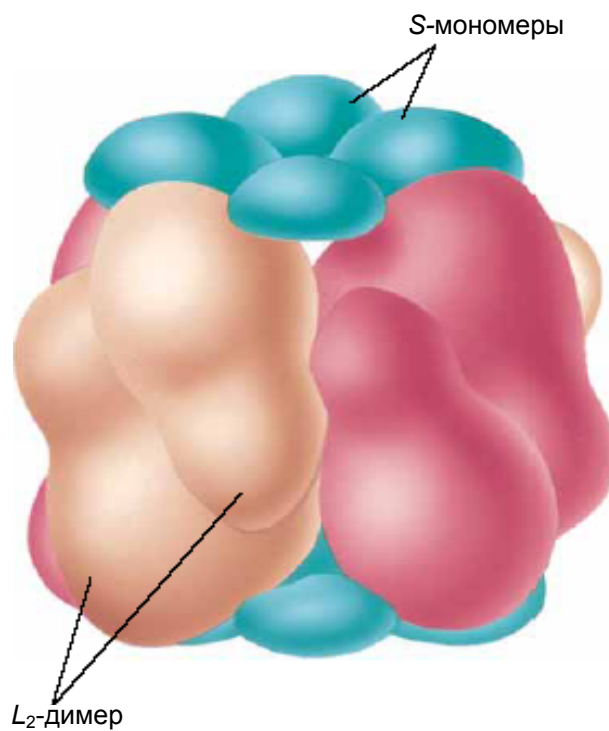


Рис. 6.28. Субъединичная структура рибулозодифосфат-карбоксилазы



## ГЛАВА 6. БИОФИЗИКА И БИОХИМИЯ ФОТОСИНТЕЗА

### 6.16. Синтез углеводов в фотосинтезирующих организмах. Цикл Кальвина

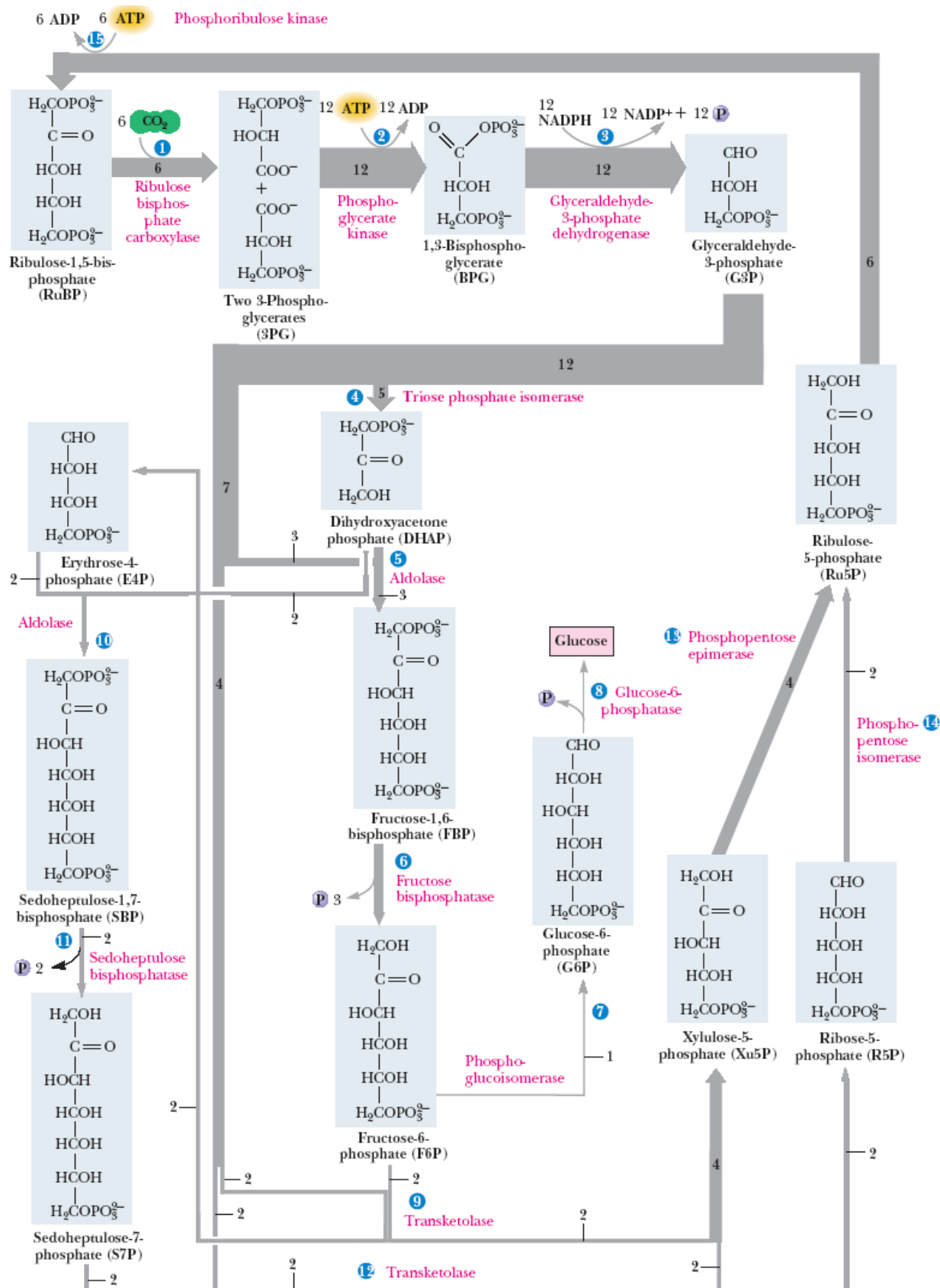
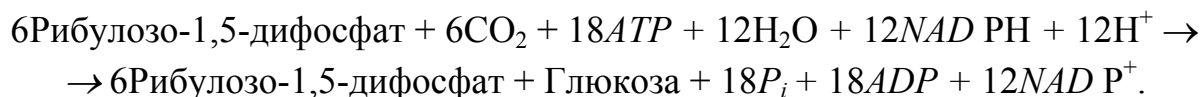


Рис. 6.29. Цикл Кальвина – превращение CO<sub>2</sub> в D-глюкозу в процессе фотосинтеза

Общее уравнение цикла Кальвина удобно записать в следующем виде:





Рибулозо-1,5-дифосфат вписан здесь в обе части уравнения, чтобы показать, что это необходимый компонент, регенерирующий в конце каждого цикла. Убрав его в обеих частях уравнения, мы получим суммарное уравнение цикла:

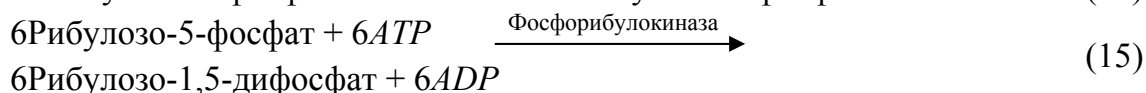
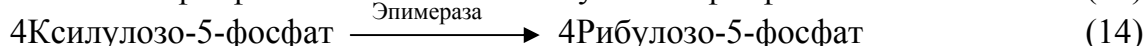
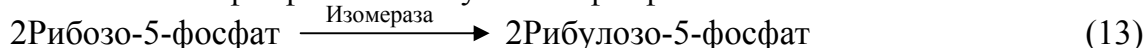
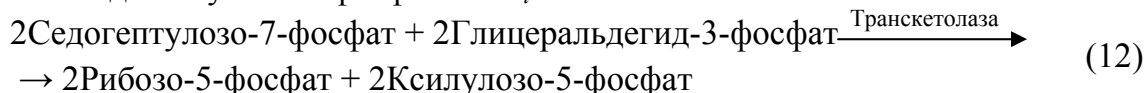
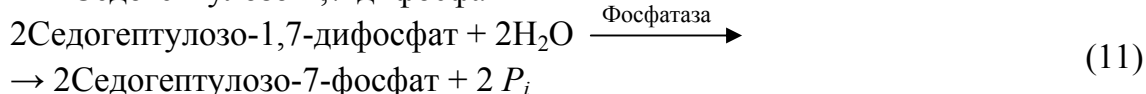
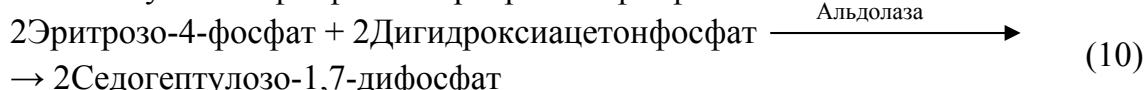
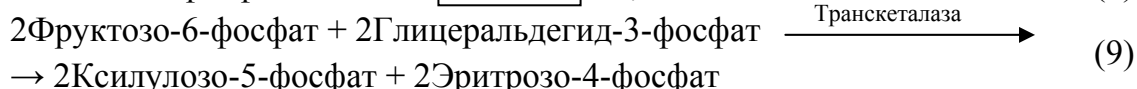
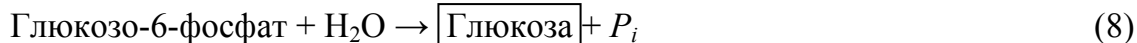
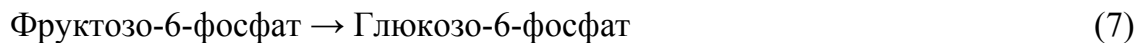
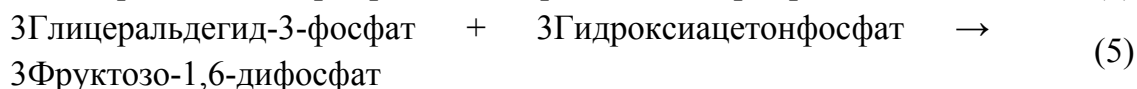
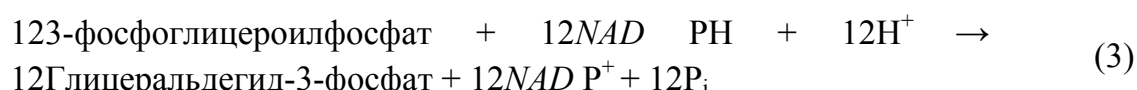
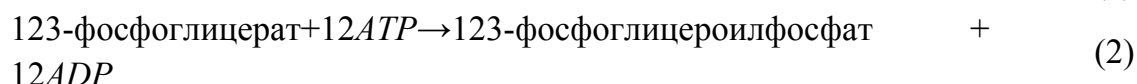
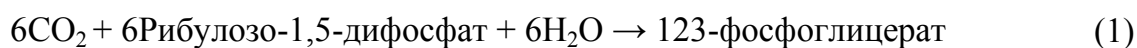
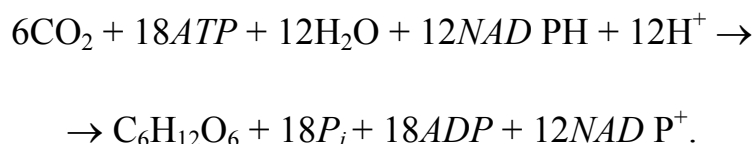


Рис. 6.30. Сбалансированные уравнения реакций для превращения CO<sub>2</sub> в глюкозу в цикле Кальвина

На синтез каждой молекулы глюкозы из шести молекул  $\text{CO}_2$  расходуются 18 молекул  $ATP$  и 12 молекул  $NADPH$ , восполняемые затем за счет световых реакций фотосинтеза.

#### 6.16.4. Баланс реакций цикла Кальвина.

Рассмотрим теперь последовательные реакции цикла Кальвина ([рис. 6.27](#) и [рис. 6.28](#)). Реакции (1)–(8) приводят к образованию глюкозы из  $\text{CO}_2$  и рибулозо-1,5-дифосфата. Реакции (9)–(15) связаны с регенерацией рибулозо-1,5-дифосфата, которая необходима для того, чтобы мог начаться новый оборот цикла Кальвина. Реакция (9) катализируется транскетолазой,  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимым ферментом, у которого простетической группой является тиаминпирофосфат. Транскетолаза катализирует обратимый перенос кетоловой группы ( $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CO}-$ ) от кетозофосфата, в данном случае от фруктозо-6-фосфата, на альдозофосфат, в данном случае на глицеральдегид-3-фосфат. В реакции (10) участвует альдолаза; она катализирует обратимую конденсацию альдегида, в данном случае эритрозо-4-фосфата, с дигидроадетонфосфатом, в результате чего образуется семиуглеродное соединение седогептулозо-1,7-дифосфат. От седогептулозо-1,7-дифосфата отщепляется фосфатная группа в положении 1, и образовавшийся седогептулозо-7-фосфат вступает в еще одну транскетолазную реакцию. Продуктами этой реакции являются два разных пентозофосфата, которые, в конечном счете, и превращаются в рибулозо-1,5-дифосфат.

На [рис. 6.31](#) цикл Кальвина показан в схематичном виде.

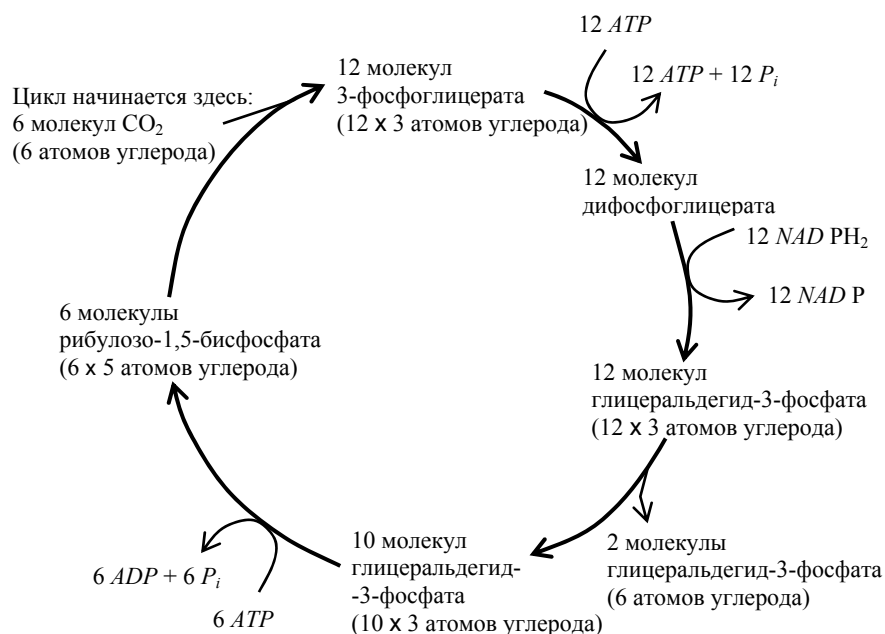
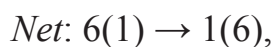
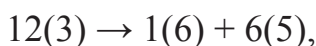
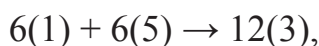


Рис. 6.31. Упрощенное изображение цикла Кальвина с указанием общего количества промежуточных продуктов и содержания углеродных атомов в них  
Баланс реакций цикла Кальвина удобно представить в виде



где номер в скобках означает количество атомов углерода в соединении, а номер перед скобками указывает на стехиометрические соотношения реакций. Так что 6(1) или 6CO<sub>2</sub> конденсируются с 6(5) или 6 молекулами рибулозо-1,5-дифосфата, в результате образуется 12 трехуглеродных молекул 3-фосфоглицерата, которые затем преобразуются в цикле Кальвина до одной гексозы 1(6) и 6 молекул рибулозо-1,5-дифосфата, содержащих по 5 углеродных атомов 6(5).

### 6.16.5. C<sub>3</sub>-растения и C<sub>4</sub>-растения.

Все реакции цикла Кальвина, за исключением первой, катализируемой рибулозодифосфаткарбоксилазой, свойственны также и животным тканям. Из-за отсутствия рибулозодифосфаткарбоксилазы организм животных не способен осуществлять реальное превращение CO<sub>2</sub> в глюкозу. Растения, у которых на первом этапе фиксации CO<sub>2</sub> участвует рибулозодифосфаткарбоксилаза, называются C<sub>3</sub>-растениями, потому что CO<sub>2</sub> включается у них в трехуглеродное соединение.

У некоторых растений (например, у кукурузы и сахарного тростника, а также у многих тропических трав, включая ползучий сорняк) цикл осуществляется по-другому. Дело в том, что углекислый газ в норме проникает через отверстия в поверхности листа, называемые *устьицами*. При высоких температурах устьица закрываются, защищая растение от чрезмерной потери влаги. В C<sub>3</sub>-растения при закрытых устьицах прекращается и поступление углекислого газа, что приводит к замедлению фотосинтеза и изменению фотосинтетических реакций. В случае же кукурузы углекислый газ присоединяется к трехуглеродной молекуле на поверхности листа, затем переносится во внутренние участки листа, где углекислый газ высвобождается и начинается цикл Кальвина. Благодаря этому довольно сложному процессу фотосинтез у кукурузы осуществляется даже в очень жаркую, сухую погоду. Растения, в которых происходит такой процесс, называются C<sub>4</sub>-растениями, поскольку углекислый газ в начале цикла транспортируется в составе четырехуглеродной молекулы. C<sub>3</sub>-растения – это в основном растения умеренного климата, а C<sub>4</sub>-растения в основном произрастают в тропиках.

Глюкозо-6-фосфат, образующийся в процессе фотосинтеза, является предшественником трех типичных растительных углеводов – сахарозы, крахмала и целлюлозы, которые в животном организме не синтезируются.

## 6.17. Организация фотосинтетического аппарата бактерий

### 6.17.1. Сравнение бактериального и растительного фотосинтеза.

Несмотря на то, что механизмы бактериального и растительного фотосинтеза имеют много общего, между ними есть некоторые 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* или *бактериородопсин*. 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 вариативность по всем этим признакам. Например, предполагают, что ряду бактерий свойственна только одна фотосистема, аналогичная фотосистеме I. Наиболее существенным доводом в пользу этого послужило отсутствие эффекта Эмерсона у некоторых микроорганизмов. Серобактерии обладают двумя фотосистемами, донором электронов у этих организмов являются различные соединения серы. В [табл. 6.1](#) представлены группы фотосинтезирующих бактерий с указанием их светособирающих пигментов и молекул, играющих роль реакционных центров.

### 6.17.2. Фотосистема пурпурных бактерий *Rhodopseudomonas viridis*.

Фотосистема пурпурных бактерий *Rhodopseudomonas viridis* похожа по строению на фотосистему II высших растений. В отличие от растений в бактериальной системе донором электронов является не вода, они поступают из электронпереносящей цепи, содержащей цитохром. На [рис. 6.32](#) приведены только трансмембранные фрагменты бактериородопсина. О примерной толщине мембраны можно судить по липидным молекулам (слева и справа). Шесть трансмембранных спиралей из трех субъединиц (показаны окрашенными в различные тона голубого цвета) формируют внутримембранное пространство, которое наполнено цепями молекул пигментов.

В *Rh. viridis* энергию света поглощают две соседние молекулы хлорофилла, образующие «специальную пару» (зеленого цвета, а ион  $Mg^{2+}$  – красного). Максимум поглощения этих молекул находится при 870 нм, поэтому бактериальный реакционный центр обозначается также  $P_{870}$ . После возбуждения электрон переносится реакционным центром на смежную свободную от магния молекулу *феофитина* (оранжевого цвета) всего за несколько пикосекунд ( $1 \text{ пс} = 10^{-12} \text{ с}$ ), а затем в течение примерно 200 пс



передается на прочно связанный *хинон*  $Q_A$  (слева наверху, желтого цвета). В то же самое время снова заполняется электронная дыра в «специальной паре». Через примерно 0,2 мс возбужденный электрон достигает обмениваемого *хинона*  $Q_B$  (справа наверху, желтого цвета), с которым покидает фотосистему.

Таблица 6.1

Характеристики фотосинтезирующих систем бактерий

Группы фотосинтезирующих эубактерий	Светособирающие пигменты			Хлорофиллы, входящие в состав реакционного центра
	Хлорофиллы	Фикобилипротеины	Основные каротиноиды	
Пурпурные бактерии	Бактериохлорофиллы $a+c, a+d, a+e$	Нет	Алифатические и арильные	Бактериохлорофиллы $a$ или $b$
Зеленые бактерии	Бактериохлорофиллы $a+c, a+d, a+e$	Нет	Арильные и алициклические	Бактериохлорофиллы $a$
Гелио-бактерии	Бактериохлорофилл $g$	Нет	Единственный алифатический: нейроспорин	Бактериохлорофиллы $g$
Циано-бактерии	Хлорофилл $a$	Фикоцианин, аллофикоцианин, фикоэритрин	Алициклические	Хлорофилл $a$
Прохлоро-фиты	Хлорофиллы $a+b$	Нет	Алициклические	Хлорофилл $a$

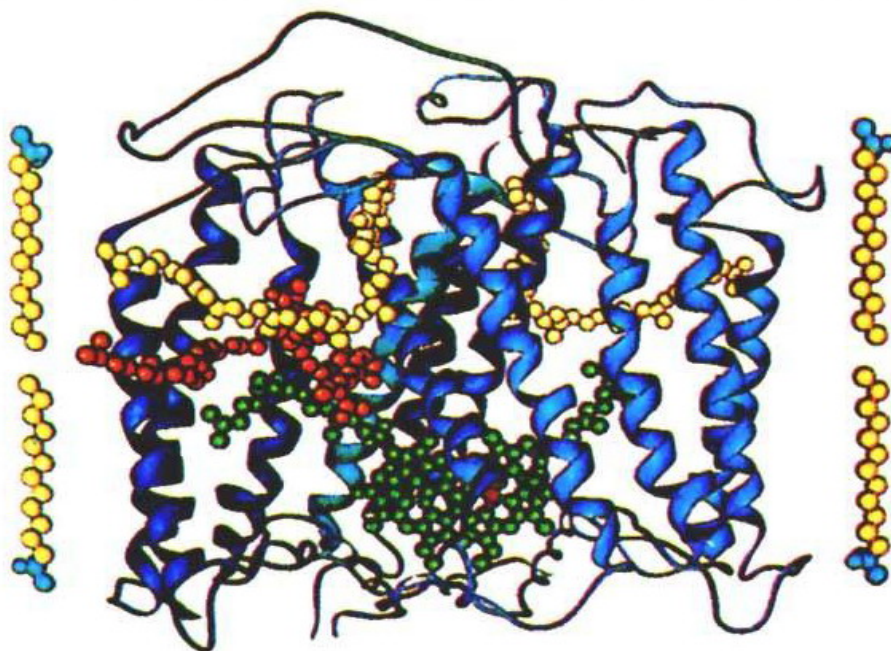


Рис. 6.32. Реакционный центр *Rhodospseudomonas viridis*

### 6.17.3. Фотосистема архебактерий *Halobacterium halobium*.

Бактерии семейства *Halobacterium* растут при крайне высоких концентрациях соли, например в морской воде. Плазматическая мембрана



этих бактерий содержит белок, подобный родопсину глаза и потому названный *бактериородопсином*. Этот белок способен непосредственно использовать энергию солнечного света для создания электрохимического градиента. В основе процесса, как и при зрительном процессе, лежит индуцируемая светом *цис-транс*-изомеризация ретиналя (рис. 6.33). Бактериородопсин, сравнительно небольшой белок, является самым простым из всех известных насосов, перекачивающих ионы  $H^+$  за счет энергии света. Молекула принадлежит к немногим трансмембранным белкам, структуры которых известны и могут служить в качестве модельных систем для подробного изучения фундаментальных механизмов энергетического обмена. Белковая часть молекулы бактериородопсина в основном состоит из 7  $\alpha$ -спиралей, пронизывающих мембрану и образующих полый цилиндр (рис. 6.34). Связь между ретиналем и полипептидной цепью осуществляется через шиффово основание, образованное в результате взаимодействия альдегидной группы ретиналя с  $\epsilon$ -аминогруппой 216-го лизинового остатка (рис. 6.35, а). Шиффово основание в темноте находится в протонированной форме. Поглощение кванта света бактериородопсином вызывает изменение конформации ретиналя и приводит к отщеплению  $H^+$  от шиффового основания (рис. 6.35, б). Протон, отделившийся на свету от шиффового основания, переходит во внеклеточное пространство, а  $H^+$ , протонирующий шиффово основание, поглощается из цитоплазмы.

Бактериородопсин, в молекуле которого шиффово основание находится в протонированной форме, поглощает свет с длиной волны 570 нм, а в депротонированной – при 412 нм.

Таким образом, под действием света бактериородопсин «перебрасывает» протоны с одной стороны мембраны на другую. В результате работы циклического механизма, получившего название *бактериородопсиновой протонной помпы*, при освещении по разные стороны мембраны возникает градиент концентрации протонов, достигающий 200 мВ, в создании которого участвуют электрический и химический компоненты. Поскольку при этом концентрация ионов  $H^+$  снаружи выше, чем внутри, эти ионы стремятся диффундировать обратно в клетку через находящиеся в мембране молекулы *АТФ*-синтезирующего фермента, напоминающего *АТФ*-синтетазу митохондрий и хлоропластов. Проходя через эту бактериальную *АТФ*-азу, ионы  $H^+$  отдают свою энергию, которая используется для синтеза *АТФ* из *АДП* и фосфата (рис. 6.36). У галофильных бактерий молекулы бактериородопсина, определенным образом ориентированные в клеточной мембране служат насосом, который под действием света выкачивает ионы  $H^+$  наружу. Возникающий в результате этого градиент ионов  $H^+$  является источником энергии для синтеза *АТФ*, катализируемого *АТФ*-синтетазой. Таким способом галофильные бактерии запасают световую энергию в форме *АТФ* в дополнение к окислительному фосфорилированию, протекающему у них при наличии кислорода. Однако галофильные бактерии не выделяют кислорода и не осуществляют фотовосстановления  $NAD P^+$ .

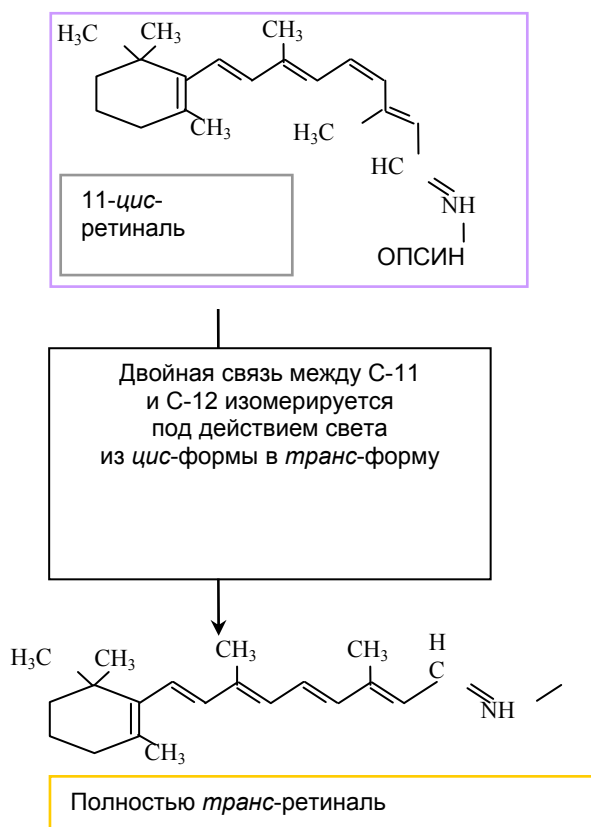


Рис. 6.33. Структурные формулы цис- и транс-ретиная

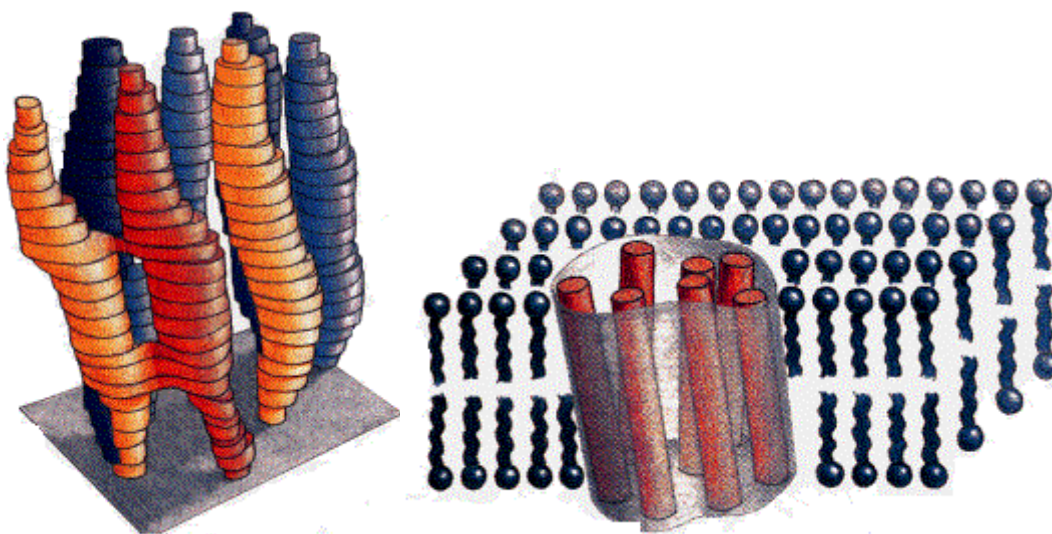
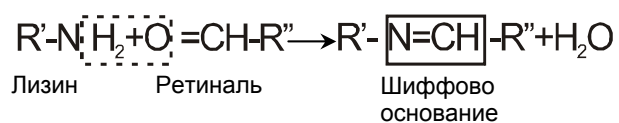
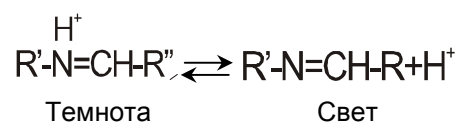


Рис. 6.34. Бактериородопсин архебактерий *Halobacterium halobium*



а



б

- Рис. 6.35. Бактериородопсин архебактерий *Halobacterium halobium*:  
 а) образование связи между ретиналом и полипептидной цепью бактериородопсина;  
 б) протонированная и депротонированная формы шиффового основания

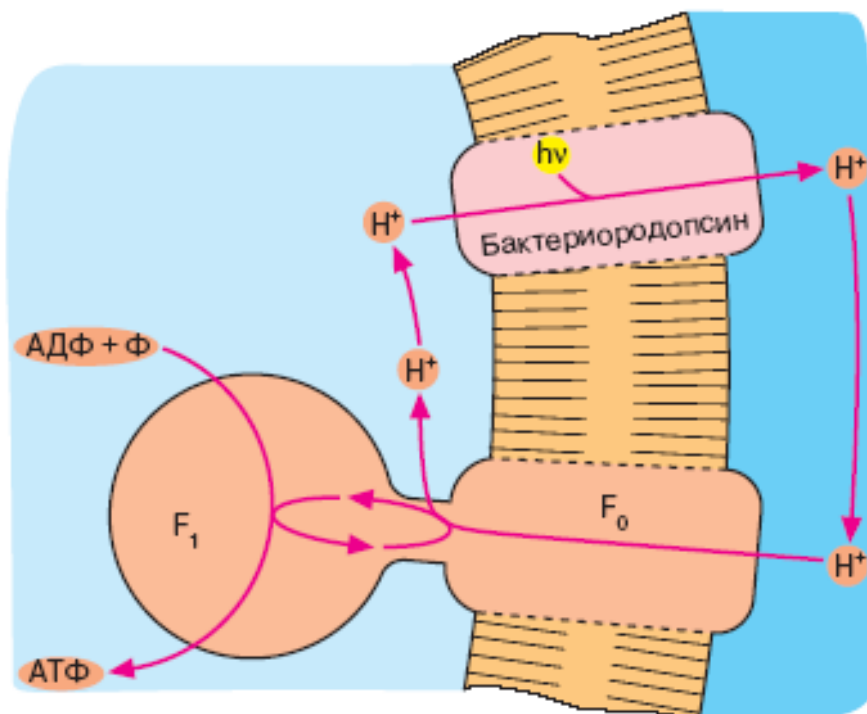


Рис. 6.36. Функционирование бактериородопсиновой протонной помпы

Фотоцикл бактериородопсина не включает каких-либо окислительно-восстановительных реакций, где подобно фотосинтезу происходил бы отрыв и перенос электрона между разными молекулами. Под действием поглощенного кванта света происходящая в результате *транс-цис*-фотоизомеризация ретиналя является триггером, «запускающим» всю дальнейшую цепь последовательных превращений фотоцикла бактериородопсина.

## 6.18. Регуляция световых и темновых стадий фотосинтеза

### 6.18.1. Фотосинтетический контроль.

Регуляция фотосинтеза, как и подавляющего большинства других процессов в природе и технике, осуществляется по принципу обратной связи. Суть этого принципа заключается в том, что скорость регулируемого процесса зависит от результата этого процесса. Как правило, в сложной системе регулируемым процессом является стадия, которая ограничивает скорость работы всей системы.

В биоэнергетике хорошо известны такие регуляторные явления, как фотосинтетический контроль (в хлоропластах) и дыхательный контроль (в митохондриях). Их проявление состоит в том, что скорости переноса электронов в фотосинтетической цепи электронного транспорта хлоропластов и дыхательной цепи митохондрий зависят от соотношения между количеством субстратов и продуктов реакции синтеза  $ATP$  ( $ADP + P_i \leftrightarrow ATP + H_2O$ ). При избытке субстратов этой реакции ( $ADP$  и  $P_i$ ) скорости переноса электронов поддерживаются на максимальных уровнях. В этих условиях идет интенсивный синтез молекул  $ATP$  (принято говорить, что при этом хлоропласты и митохондрии находятся в метаболическом состоянии 3). После того как наступает истощение молекул  $ADP$  и появляется избыток  $ATP$ , скорость электронного транспорта замедляется (рис. 6.37).



Рис. 6.37. Зависимость скорости фотосинтетического переноса электронов от времени освещения хлоропластов

Торможение электронного транспорта, обусловленное образованием избыточного количества конечного продукта ( $ATP$ ), связывают с переходом хлоропластов и митохондрий соответственно в состояния фотосинтетического и дыхательного контроля (метаболическое состояние 4). Ключевую роль в явлениях фотосинтетического и дыхательного контроля играют процессы протонного транспорта, сопряженного с реакциями синтеза  $ATP$ . Механизмы этих явлений в хлоропластах и митохондриях имеют сходную природу. Рассмотрим процессы регуляции электронного переноса и синтеза  $ATP$  в хлоропластах.

### 6.18.2. Регуляция электронного транспорта.

Как уже было отмечено, работа фотосинтетической цепи электронного транспорта приводит к накоплению ионов водорода внутри тилакоидов и, следовательно, к уменьшению внутритилакоидного рН. Специальные измерения показали, что значение рН внутритилакоидного пространства при освещении хлоропластов может понижаться на 2,5–3 единицы рН ([рис. 6.38](#)). Эти изменения обуславливают активность ключевых ферментов цикла Кальвина.

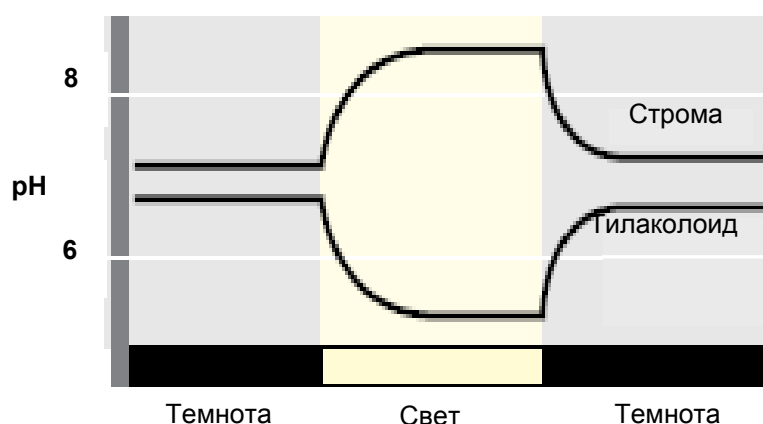


Рис. 6.38. Индуцированные светом изменения рН в хлоропластах

Закисление внутритилакоидного пространства вызывает торможение электронного транспорта. Это происходит на самом медленном участке в цепи переноса электронов от воды к  $NAD P^+$  — на стадии окисления пластохинона. Скорость окисления пластохинона зависит от концентрации ионов водорода внутри тилакоидов: чем выше их концентрация (ниже значение рН), тем медленнее происходит окисление  $QH_2$ . Связано это с тем, что переносу электронов от пластохинола ( $QH_2$ ) и его полувосстановленной формы пластосемихинона ( $QHJ$ ) к  $b/f$ -комплексу (реакции (6.2) и (6.4)) предшествуют стадии диссоциации протона во внутритилакоидный объем (реакции (6.1) и (6.3)):



Заряженные формы пластохинона  $QH^-$  и пластосемихинона  $QJ^-$  являются непосредственными донорами электрона для  $b/f$ -комплекса. Реакции диссоциации (1) и (3), в ходе которых образуются активные формы восстановленного пластохинона  $QH^-$  и  $QJ^-$ , зависят от pH внутри тилакоидов. По мере увеличения концентрации ионов водорода во внутритилакоидном пространстве вероятность диссоциации протона уменьшается, так как в этом случае за счет повышенного давления протонов равновесие в реакциях (6.1) и (6.3) сдвигается влево, т. е. в сторону образования неактивных протонированных форм пластохинола  $QH_2$  и пластосемихинона  $QHJ$ . Именно поэтому накопление ионов водорода внутри тилакоидов вызывает замедление скорости электронного транспорта.

В то же время скорость работы цепи электронного транспорта зависит от содержания  $ADP$  и  $ATP$  в хлоропластах. Действительно, несмотря на то что молекулы  $ADP$  и  $ATP$  сами непосредственно не взаимодействуют с цепью электронного транспорта, они влияют на выход протонов из тилакоидов наружу через  $ATP$ -синтазный комплекс. При избытке молекул  $ADP$  скорость работы  $ATP$ -синтазного комплекса велика. Это значит, что наряду с поступлением протонов внутрь тилакоидов происходит их интенсивный выход наружу через  $ATP$ -синтазу (рис. 6.37, состояние 3). Поэтому в условиях синтеза  $ATP$  не происходит столь сильного закисления внутритилакоидного пространства, которое могло бы вызвать торможение электронного транспорта. После истощения запаса молекул  $ADP$  синтез  $ATP$  практически останавливается, а вместе с этим резко снижается скорость выхода протонов наружу (рис. 6.37, состояние 4). При этом, однако, цепь переноса электронов работает, поэтому протоны продолжают поступать внутрь тилакоидов. Поскольку при отсутствии  $ADP$  канал быстрого выхода протонов наружу через  $ATP$ -синтазу практически закрыт, то после истощения  $ADP$  концентрация протонов внутри тилакоидов увеличится, и, соответственно значение внутритилакоидного pH дополнительно понизится. Как было сказано выше, уменьшение pH внутри тилакоидов замедляет окисление пластохинона и тем самым тормозит перенос электронов между фотосистемами.

### 6.18.3. Регуляция распределения света в хлоропластах.

Одним из наиболее распространенных механизмов регуляции биохимических реакций является химическая модификация ферментов, влияющая на их каталитическую активность. В хлоропластах имеются два эффективных способа регуляции активности белков фотосинтетического аппарата: 1) фосфорилирование белков и 2) редокс-регуляция путем восстановления тиоловых (сульфгидрильных) групп аминокислот, входящих в состав белков.

В хлоропластах для согласования совместной работы двух фотосистем должен существовать механизм, обеспечивающий оптимальное



распределение энергии поглощаемого света между светособирающими антеннами комплексов фотосистем I и II. Необходимость существования такого механизма очевидна. Действительно, если, например, светособирающая антенна фотосистемы II получает существенный избыток квантов света по сравнению с фотосистемой I, то эффективность использования энергии света в фотосистеме II будет невелика. В этом случае за счет более частого срабатывания реакционных центров фотосистемы II на участке цепи электронного транспорта между фотосистемами I и II накопится избыток восстановленных переносчиков, которые не будут успевать окисляться редко работающими реакционными центрами фотосистемы I. Этого можно избежать, если изменить соотношение между размерами светособирающих антенн фотосистем I и II, увеличив размер антенны фотосистемы I за счет уменьшения антенны фотосистемы II.

Для регуляции распределения света в хлоропластах наряду с основными светособирающими пигментными комплексами, жестко связанными с фотосистемами I и II, имеется лабильный (подвижный) светособирающий комплекс 2 (сокращенно ССК2). Этот комплекс выполняет роль дополнительной антенны, предназначенной для усиления светосбора одной из фотосистем. В хлоропластах комплексы фотосистемы I и II находятся в мембранах тилакоидов гран и межгранных тилакоидов ([рис. 6.39, а](#)). Однако распределены они между этими тилакоидами неравномерно. Основная часть комплексов фотосистемы I локализована в межгранных тилакоидах, в то время как большинство комплексов фотосистемы II находится в тилакоидах гран. Предполагается, что в условиях низкой освещенности ССК2 располагаются в основном в тилакоидах гран рядом с фотосистемой II, благодаря чему общий размер светособирающей антенны фотосистемы II увеличен ([рис. 6.39, б](#)). Однако в определенных условиях, когда возникает необходимость увеличить эффективность работы фотосистемы I, этот лабильный светособирающий комплекс покидает фотосистему II и, перемещаясь в плоскости мембраны в сторону межгранных тилакоидов, стыкуется с фотосистемой I ([рис. 6.39, в](#)). Сигналом для срабатывания механизма, вызывающего перемещение ССК2, служит образование избытка восстановленных переносчиков в цепи электронного транспорта между фотосистемами. Такой избыток может возникать, например, при более частом срабатывании реакционных центров фотосистемы II по сравнению с фотосистемой I. Перемещение ССК2 к фотосистеме I помогает хлоропластам разгрузить цепь переноса электронов между фотосистемами за счет более частого срабатывания фотосистемы I.

Механизм перераспределения ССК2 между светособирающими антеннами фотосистем I и фотосистем II связан с фосфорилированием одной из субъединиц этого комплекса. Переполнение цепи электронного

транспорта служит сигналом для включения в работу протеинкиназы – фермента, катализирующего перенос фосфата с молекулы АТФ на ССК2 (рис. 6.39). В результате такой модификации ССК2 теряет связь с фотосистемами II. Предполагается, что фосфорилированный комплекс выталкивается из тилакоидов гран, где сосредоточена большая часть фотосистем II, и перемещается в межгранные тилакоиды, обогащенные комплексами фотосистем I.

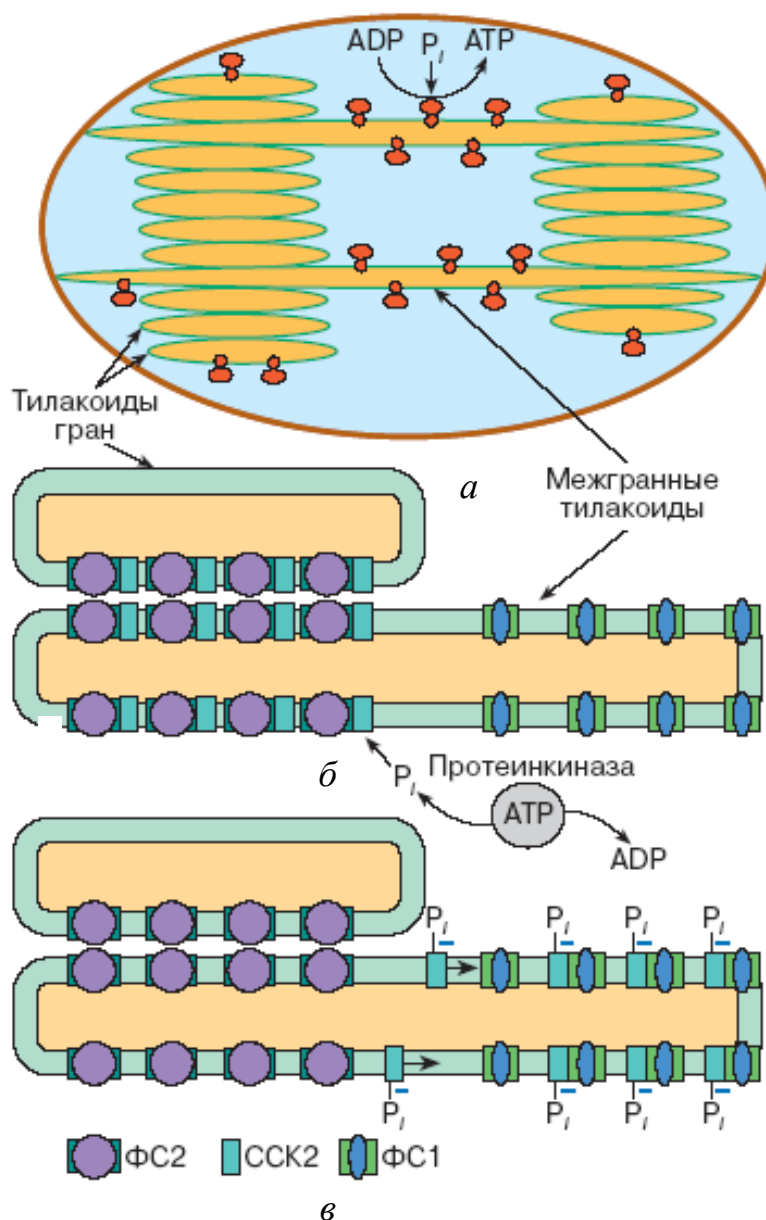


Рис. 6.39. Схематическое изображение хлоропласта в разрезе (а) и распределение фотосистем I и II в тилакоидах гран и межгранных тилакоидах (б, в)

Фосфорилирование лабильного светособирающего комплекса ССК2, катализируемое протеинкиназой, приводит к перераспределению энергии между светособирающими антенными комплексами фотосистем. В структурном состоянии (рис. 6.39, б) комплексы ССК2 не содержат фосфатных групп и находятся в непосредственной близости от фотосистем II, локализованных в тилакоидах гран. Фосфорилирование ССК2 в результате

протеинкиназной реакции, сопровождающееся появлением на поверхности ССК2 отрицательного заряда, приводит к вытеснению заряженных комплексов ССК2 из тилакоидов гран в межгранные тилакоиды, в результате чего возрастает размер светособирающей антенны фотосистем I.

Силы, вытесняющие фосфорилированные комплексы ССК2 из гран, имеют электростатическую природу. После присоединения к ССК2 отрицательно заряженного фосфата им становится энергетически невыгодно находиться вблизи друг от друга в тилакоидах гран, которые тесно примыкают друг к другу (рис. 6.39, в). Поэтому фосфорилированные комплексы ССК2 перемещаются в межгранные тилакоиды, которые пространственно разнесены. В результате такой структурной реорганизации размеры светособирающей антенны фотосистем II уменьшаются, а фотосистем I увеличиваются (рис. 6.39, в). Этим достигается оптимальное распределение поглощаемой энергии света между фотосистемами, когда скорость поступления электронов от фотосистем II оказывается согласованной с частотой срабатывания реакционных центров фотосистем I.

Описанный механизм позволяет фотосинтетическому аппарату хлоропластов адекватно реагировать на изменения условий освещения. Если в ходе работы хлоропластов возникнет необходимость увеличить размеры светособирающей антенны фотосистем II (например, в ответ на изменение интенсивности или спектрального состава света, падающего на лист), то в работу включится протеинфосфатаза – фермент, катализирующий отщепление фосфата от белков. После этого дефосфорилированные комплексы ССК2 могут снова переместиться в тилакоиды гран, где сосредоточено большинство антенн фотосистем II. Таким образом, своевременное включение различных ферментов – протеинкиназы и протеинфосфатазы – позволяет хлоропластам оптимизировать распределение энергии света между светособирающими антеннами фотосистем.

#### 6.18.4. Регуляция активности ферментов фотосинтетического аппарата.

Лимитирующим этапом, определяющим скорость *темновых* реакций, является фиксация  $\text{CO}_2$  в реакции, катализируемой рибулосодифосфаткарбоксилазой и приводящей к образованию 3-фосфоглицерата. Рибулосодифосфаткарбоксилаза, молекула которой состоит из 16 субъединиц, относится к аллостерическим ферментам. Она может активироваться под воздействием трех разных изменений, каждое из которых представляет собой результат освещения хлоропластов. Это следующие изменения:

1. *Повышение pH.* При освещении хлоропластов ионы  $\text{H}^+$  переходят из стромы в тилакоиды. Это приводит к повышению pH стромы и активирует карбоксилазу, находящуюся на наружной поверхности тилакоидной мембраны.

2. *Поступление в строму ионов  $\text{Mg}^{2+}$ .* Ионы  $\text{Mg}^{2+}$  поступают в строму, когда ионы  $\text{H}^+$  при освещении хлоропластов переходят из стромы в тилакоиды.

3. *Накопление*  $NADPH$ , генерируемого при освещении фотосистемой I.

Таким образом, хотя фиксация  $CO_2$  под действием рибулозодифосфат-карбоксилазы принадлежит к темновым реакциям, она косвенным образом стимулируется освещением хлоропластов.

Таким же непрямым путем активируются в результате освещения хлоропластов и некоторые другие ферменты, участвующие в цикле Кальвина, а также  $ATP$ -синтетаза. Как и в случае рибулозодифосфаткарбоксилазы, активность  $ATP$ -синтазы зависит от редокс-состояния входящих в ее состав тиоловых групп.  $ATP$ -синтетаза находится в неактивном состоянии, когда тиоловые группы окислены (при этом они образуют  $-S-S-$ мостики), или в активном состоянии, когда тиоловые группы восстановлены (находятся в состоянии  $-SH$ ). Посредником между цепью электронного транспорта хлоропластов, служащей источником электронов для активации  $ATP$ -синтазы является специальный белок – тиоредоксин. Тиоредоксины подвержены окислительно-восстановительным превращениям в клетке за счет изменения входящих в их состав тиоловых групп ([рис. 6.40](#)).

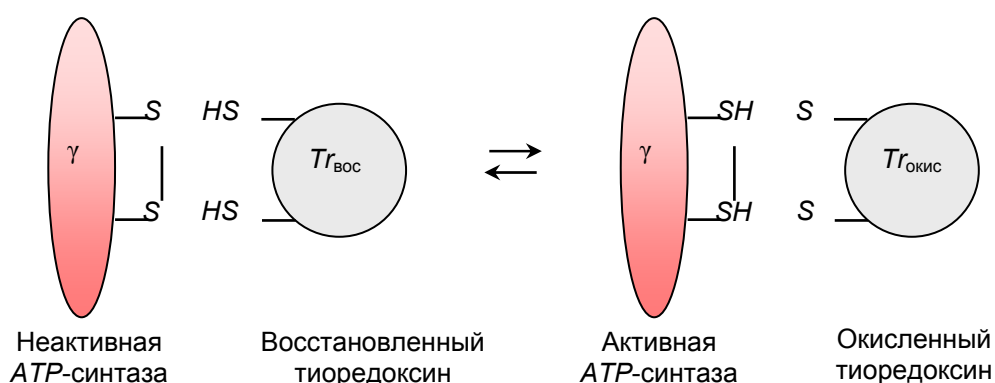


Рис. 6.40. Схема активации  $ATP$ -синтазы тиоредоксином

Естественно, также возникает вопрос: зачем нужно регулировать активность  $ATP$ -синтазы? Не проще ли постоянно иметь в хлоропластах высокоактивный фермент, способный сразу же после начала освещения синтезировать  $ATP$ ? Оказывается, нет. Дело в том, что наряду с  $ATP$ -синтазной активностью (образование  $ATP$ ) этот фермент обладает еще способностью гидролизовать  $ATP$  ( $ATP$ -азная активность). Поскольку для расщепления  $ATP$ -ферменту не требуется энергии, то гидролиз  $ATP$  может происходить в темноте. Очевидно, что с энергетической точки зрения в темноте растению невыгодно иметь активную  $ATP$ -азу, которая напрасно расходовала бы запас молекул  $ATP$ , накопленных во время освещения. Поэтому в темноте  $ATP$ -синтаза хлоропластов обычно находится в неактивном состоянии. С началом освещения, когда в хлоропластах появляются условия для синтеза  $ATP$ , необходимо привести  $ATP$ -синтазу в активное состояние.

Первым сигналом для активации *АТФ*-синтазы служит появление в цепи электронного транспорта восстановленных переносчиков на акцепторном участке фотосистемы I. Восстановленные молекулы ферредоксина служат донорами электронов для тиоредоксина, который, в свою очередь, изменяет окислительно-восстановительное состояние *АТФ*-синтазы. Взаимодействуя с *АТФ*-синтазой, тиоредоксин восстанавливает –S–S-мостики субъединицы  $\gamma$ , в результате чего фермент переходит в активное состояние. Для активации *АТФ*-синтазы необходимо также, чтобы в ней произошли определенные структурные изменения, которые затрагивают относительно небольшую субъединицу  $\epsilon$ , выполняющую регуляторные функции. Структурные изменения, активирующие *АТФ*-синтазу, происходят в результате энергизации тилакоидной мембраны при освещении хлоропластов. В темноте *АТФ*-синтаза дезактивируется. Переключение между неактивным и активным состояниями *АТФ*-синтазы происходит сравнительно быстро (несколько секунд – десятки секунд), что наряду с другими регуляторными механизмами способствует достижению максимальной эффективности синтеза *АТФ*.

## 6.19. Использование люминесценции фотосинтетических пигментов в экологии

### 6.19.1. Биофизические методы экспресс-диагностики.

Хорошо известно, какое значение в современных условиях сильного антропогенного воздействия на внешнюю среду имеет экологический мониторинг. Его успешное проведение должно позволить прогнозировать изменение характеристик отдельных звеньев экологической системы и на основании этого предсказать дальнейшую эволюцию экосистемы во времени. Принципиальное значение в этом отношении имеет получение экспресс-информации состояния клеток организмов в результате различных внешних воздействий. Имеется в виду информация, которая позволила бы уже на ранних этапах диагностировать изменение клеточного метаболизма под влиянием внешних факторов. Принципиально важно получить эту информацию задолго до того, как результат внешних воздействий на организмы проявится в видимых признаках, таких как изменение формы и задержка роста клеток, уменьшение численности клеточной популяции и общей биомассы. Конечно, эти признаки также важны для характеристики состояния как отдельных звеньев, так и экосистемы в целом. Однако на основании их изменения можно констатировать лишь конечный эффект оказанного воздействия, результат того, что уже произошло. Поэтому в первую очередь используют признаки, которые могут служить источником информации для ранней диагностики нарушения состояния клетки при внешних воздействиях. Отвечающие этим требованиям современные биофизические методы экспресс-диагностики состояния клеток основаны на



регистрации начальных нарушений клеточного метаболизма в основном на мембранном уровне организации клетки.

Наибольшее развитие в последние годы получили различные спектральные и люминесцентные методы, которые используются главным образом для диагностики состояния клеток микроводорослей под влиянием факторов среды в водных экосистемах. В природных водоемах различные антропогенные загрязнения могут оказать существенное угнетающее влияние на фотосинтетический аппарат водорослей, что в итоге уменьшает продуктивность всей водной экологической системы. Регистрация действия внешних факторов на состояние фотосинтетических мембран клеток микроводорослей позволяет тем самым следить и за состоянием водной среды.

Основная идея такого подхода состоит в том, что хлорофилл, находящийся в фотосинтетических мембранах, служит своего рода природным датчиком состояния клеток водорослей и высших растений. При нарушении состояния фотосинтетических мембран под действием внешнего фактора происходят определенные изменения оптических свойств хлорофилла, которые и служат источником информации для экспресс-диагностики состояния клеток. Этому обстоятельству способствует то, что в фотосинтетическом аппарате фотосистема II, ответственная за разложение воды и выделение кислорода, является чувствительной мишенью для таких внешних факторов, как экстремальные температуры, избыточная освещенность, соли тяжелых металлов, высушивание, повышение содержания солей в питательной среде. Причем предлагаемые далее люминесцентные методы отражают такие изменения в фотосинтетическом аппарате, которые происходят на самых начальных этапах внешнего воздействия. Дело в том, что первичные стадии фотосинтеза водорослей при действии факторов внешней среды не остаются неизменными, а активно регулируются клеткой в соответствии с ее физиологическим состоянием. Цель этой регуляции заключается в оптимальном сопряжении световых и темновых стадий фотосинтеза, необходимом для поддержания определенного уровня метаболизма в измененных внешних условиях.

### **6.19.2.Переменная флуоресценция хлорофилла.**

Характер изменения первичных стадий фотосинтеза непосредственно отражается в изменении флуоресценции хлорофилла в фотосинтетических мембранах клеток. Для понимания этой взаимосвязи достаточно напомнить, что поглощение кванта света переводит молекулу хлорофилла в электронное возбужденное состояние, энергия которого в растворе при отсутствии фотосинтеза переходит либо в тепло, либо в флуоресценцию. В клетке в основном флуоресцирует хлорофилл, принадлежащий фотосистеме II, и именно изменения его флуоресценции говорят о состоянии реакционных центров этой фотосистемы. При активном фотосинтезе, когда все реакционные центры (РЦ) находятся в открытом рабочем состоянии, в



условиях слабого освещения почти вся поглощенная энергия света используется в процессе фотосинтеза. Поэтому интенсивность флуоресценции хлорофилла в клетке намного ниже, чем в растворе (рис. 6.41). Однако и здесь небольшая часть энергии электронного возбуждения (не более 3 %) переходит в энергию света флуоресценции в виде так называемой фоновой флуоресценции  $F_0$ . Как правило, в нормальных условиях величина  $F_0$  мала, что говорит об активном использовании клетками энергии поглощенного света. Но если при каких-либо воздействиях нарушается состояние фотосинтетических мембран, то центры переходят в неактивное (закрытое) состояние, когда происходит прекращение потока электронов в первичных процессах фотосинтеза.

В этих условиях поглощенная энергия света уже не может использоваться в фотосинтезе, поэтому и флуоресценция хлорофилла возрастает. Можно полностью вывести из рабочего состояния РЦ, например, при действии ингибитора потока электронов диурона. В этом случае флуоресценция сильно возрастает и приближается к своим максимальным значениям  $F_m$ . Заметим, что закрыть центры можно, создавая также избыточную освещенность клеток, когда происходит световое насыщение фотосинтеза. Фотосинтетическая цепь переноса электрона как бы захлебывается от избытка поглощенной световой энергии, переводя все большую часть поглощенной энергии света во флуоресценцию.

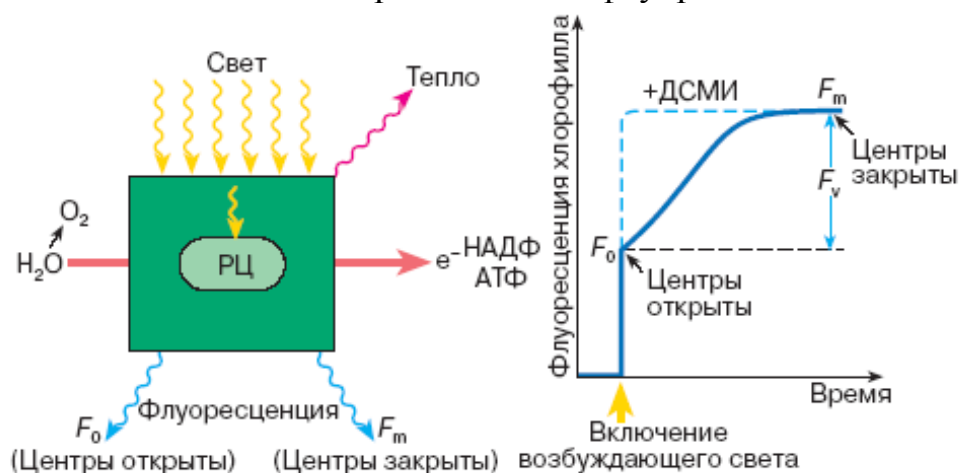


Рис. 6.41. Схема, иллюстрирующая конверсию энергии света в фотосистеме II с образованием  $ATP$  и восстановлением  $NADH$ : РЦ – реакционный центр фотосистемы II; флуоресценция  $F_0$  и  $F_m$  при активных и неактивных реакционных центрах фотосистемы II соответственно; справа – изменение флуоресценции во времени при закрытии центров (переход  $F_0 \rightarrow F_m$ ); пунктирная линия – изменение флуоресценции в присутствии диурона (ДСМИ)

Можно найти разницу между интенсивностями флуоресценции хлорофилла при закрытых и открытых РЦ ( $F_v = F_m - F_0$ ), которую называют переменной флуоресценцией ( $F_v$ ) хлорофилла в клетках (рис. 6.41). Как видно, величина  $F_v$  соответствует той части энергии света, которая используется открытыми реакционными центрами в фотосинтезе, т. е. может

характеризовать активность начальных стадий фотосинтеза. На практике оценивают отношение  $F_v/F_m$ , величина которого тесно связана с первичной продуктивностью фитопланктона в природных водоемах. Она хорошо коррелирует с фотосинтетической продукцией клеток, определенной классическими методами по восстановлению  $\text{CO}_2$  с помощью радиоактивных изотопов  $^{14}\text{C}$ .

### 6.19.3. Замедленная флуоресценция хлорофилла.

Другим источником информации о характере функционирования фотосинтетического аппарата является процесс замедленной флуоресценции (ЗФ), обнаруженный Арноном и Стреллером в 1951 году. Это явление состоит в том, что после светового возбуждения в фотосинтезирующих клетках наблюдается слабое, длительно затухающее свечение, испускаемое хлорофиллом. Это свечение возникает уже после прекращения флуоресценции ( $F_0$ ) за счет энергии, выделяемой в ходе темновых реакций первичных фотопродуктов фотосинтеза в РЦ (рис. 6.42).

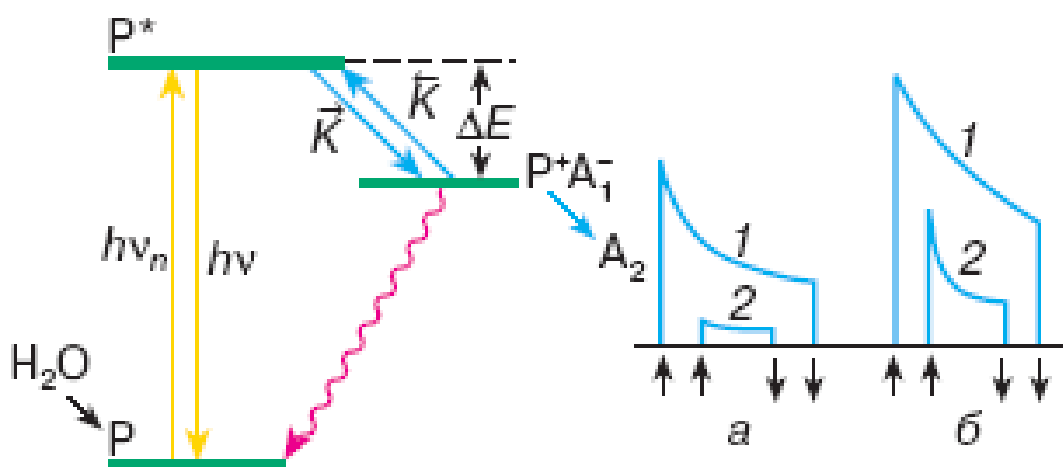
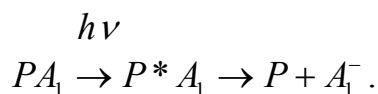


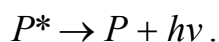
Рис. 6.42. Схема возникновения замедленной флуоресценции хлорофилла листьев и водорослей при возвращении от  $A_1^-$  на  $P$  (первичный акцептор фотонов):  $K^+$  – прямой перенос электрона  $P^*A_1 \rightarrow P^+A_1^-$ .  $K^-$  – обратный перенос электрона  $P^+A_1^- \rightarrow P^*A_1 \rightarrow P + h\nu$ , сопровождающийся замедленной флуоресценцией; 1 – Сигналы замедленной флуоресценции: а – листьев гороха (нормальное растение (1) и мутант с нарушениями в реакционном центре фотосистемы II (2); б – зеленой водоросли хлореллы: контроль (1) и при действии загрязнений  $\text{CuSO}_4$  (2)

Рассмотрим упрощенную схему этого процесса. В РЦ при поглощения кванта света ( $h\nu$ ) возбуждается молекула хлорофилла реакционного центра  $P$  ( $P \rightarrow P^*$ ). Затем происходит переход электрона от  $P^*$  на первичный акцептор электрона  $A_1$  (восстановление первичного акцептора электронами  $A_1$ )  $P^*A_1 \rightarrow P +$

+  $A_1^-$ . Это одновременно сопровождается окислением фотоактивного хлорофилла РЦ ( $P$ ) (рис. 6.42):



Затем электрон уходит от акцептора  $A_1^-$  дальше в цепь переносчиков и в итоге попадает на окисленную молекулу  $NAD P^+$ . Окисленный РЦ фотосистемы II ( $P^+$ ), в свою очередь, восстанавливается за счет электрона, полученного при разложении воды. Эти этапы ответственны за генерацию первичного прямого потока электронов (рис. 6.42). Однако существует небольшая вероятность обратного переноса электрона в РЦ от  $A_1^-$  к  $P^+$ , при котором происходит его рекомбинация с  $P^+$  с регенерацией возбужденного состояния  $P^*$ . В результате этого клетки испускают замедленное свечение с некоторой задержкой во времени:



Очевидно, интенсивность ЗФ пропорциональна количеству РЦ в состоянии  $P^+ A_1^-$  с разделенными зарядами. Это состояние зависит от скорости последующих стадий переноса электрона. При действии повреждающих факторов на фотосинтетический аппарат концентрация РЦ в состоянии  $P^+ A_1^-$  может изменяться. Это позволяет использовать ЗФ для обнаружения загрязнений в водной среде (рис. 6.43, а, б, кривые 2). Кроме того, оказалось, что интенсивность ЗФ увеличивается за счет энергии трансмембранного электрохимического потенциала на мембранах хлоропластов, необходимого для синтеза молекул  $ATP$ . Это также позволило использовать метод ЗФ для оценки степени энергизации мембраны хлоропластов и связанной с ней фотосинтетической продуктивности фитопланктона.

#### 6.19.4. Хемилюминесценция и термолюминесценция хлорофилла.

Для получения информации о процессах разрушения клеточных мембран используется также хемилюминесценция молекул хлорофилла. Известно, что действие неблагоприятных факторов может нарушать состояние липидов клеточных мембран и активировать процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ). Ускорение перекисного окисления является универсальной ответной реакцией клеток на действие неблагоприятных факторов внешней среды. В частности, уровень продуктов ПОЛ резко увеличивается в растительных клетках при холодовом и тепловом шоке и интенсивном освещении.

Факторами, способствующими развитию ПОЛ, являются активные формы кислорода. Активные формы кислорода: электронно-возбужденный синглетный кислород и анион-радикал или супероксид-радикал кислорода могут образовываться в фотосинтетических мембранах за счет энергии возбужденного фотоактивного хлорофилла  $P^*$  и электронов в цепи фотосинтеза. При повышенной освещенности клеток, а также при повреждении состояния фотосинтетических мембран и нарушении сопряжения световых и темновых стадий фотосинтеза создается избыток неиспользуемой энергии электронного возбуждения хлорофилла и электронов в цепи переносчиков электронов. Это и способствует генерации активных форм кислорода и ПОЛ. В фотосинтетических мембранах в процессах ПОЛ образуются гидроперекиси липидов, концентрация которых служит показателем нарушения состояния клеточных мембран. Распад гидроперекисей происходит с образованием электронно-возбужденных химических продуктов карбонильной природы. Их способность с высокой эффективностью передавать энергию возбуждения на хлорофилл приводит к медленно затухающей хемилюминесценции хлорофилла. Это обстоятельство и позволило разработать люминесцентный метод регистрации продуктов ПОЛ в клетках фотосинтезирующих организмов.

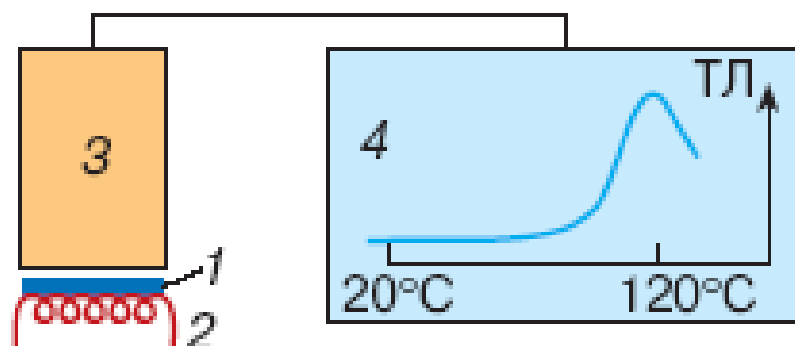


Рис. 6.43. Схема устройства для регистрации высокотемпературной термолюминесценции хлорофилла листьев и фитопланктона: 1 – объект; 2 – нагреватель; 3 – фотоприемник; 4 – регистрирующее устройство

При повышении температуры активируется распад гидроперекисей, а интенсивность хемилюминесценции хлорофилла возрастает, достигая максимума при 120 °С ([рис. 6.44](#)). Величина такой высокотемпературной термолюминесценции (ТЛ) прямо пропорциональна количеству накопленных в темноте продуктов ПОЛ. Регистрируя интенсивность ТЛ хлорофилла, можно исследовать процессы ПОЛ в клетках микроводорослей и фитопланктона в природных условиях. Из [рис. 6.44](#) видно, что в начальный

период освещения (1–20 мин) падение эффективности фотосинтеза  $F_v/F_m$  не сопровождается гибелью клеток  $N$  и появлением продуктов ПОЛ.

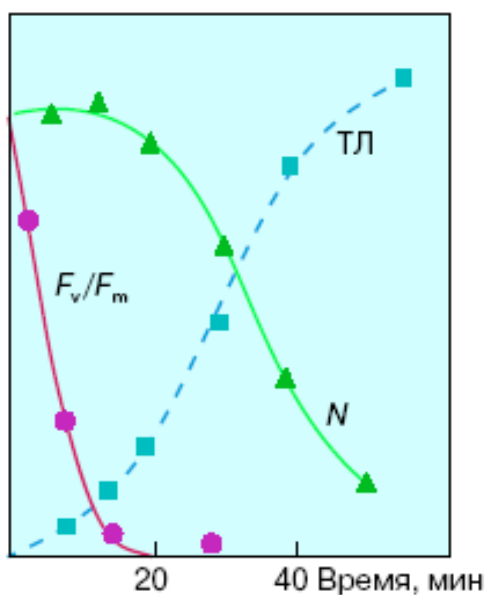


Рис. 6.44. Влияние интенсивного освещения ( $1000 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ ) на фотосинтетическую активность  $F_v/F_m$ , амплитуду высокотемпературной термолюминесценции и выживаемость клеток хлореллы  $N$

Высокий уровень ТЛ фитопланктона при  $120^\circ \text{C}$  регистрируется при неблагоприятных для активного роста условиях. В целом метод регистрации ТЛ обладает высокой чувствительностью и благодаря простоте процедуры подготовки образцов и измерения люминесценции очень удобен для экспресс-анализа большого количества препаратов.

#### 6.19.5. Взаимодействие света с фитоценозами.

Среди неблагоприятных факторов среды, влияющих на состояние клеток микроводорослей и фотосинтетическую продуктивность фитопланктона, наибольшее значение имеют свет повышенной интенсивности, неблагоприятные температуры, недостаток минерального питания, антропогенные загрязнения.

Конечно, свет как источник энергии совершенно необходим для фотосинтеза. Однако он одновременно может быть и повреждающим фактором. При действии повышенных интенсивностей света в результате процессов фотоингибирования фотосинтеза развиваются длительные и глубокие перестройки фотосинтетического аппарата. Механизм этого явления также связан с тем, что в условиях блокирования переноса электронов из-за образования их избытка в цепи фотосинтеза происходит генерация активных форм кислорода, приводящая к окислительному стрессу и разрушению клеточных мембран в процессе ПОЛ. В качестве защитного

механизма в клетке происходит распад белков РЦ, который приводит к прекращению фотосинтеза. Иными словами, клетка скорее предпочитает лишиться РЦ как источника фотодеструкции с тем, однако, чтобы потом его восстановить в более благоприятных условиях.

Распад РЦ происходит по механизму протеолитического расщепления белка ( $D_1$ ) реакционного центра фотосистемы II. Для реактивации РЦ необходимы повторный синтез (ресинтез)  $D_1$ -белка и его встраивание в РЦ. На обычном свете устанавливается равновесие между процессом фотоингибирования с распадом  $D_1$ -белка и процессом реактивации с его ресинтезом. Однако при длительном интенсивном освещении могут происходить уже необратимые повреждения РЦ, сопровождающиеся глубокой фотодеструкцией мембран вследствие развития ПОЛ.

На [рис. 6.44](#) показано, что под действием повышенных интенсивностей света в начальный период освещения (1–20 мин) падает фотосинтетическая эффективность ( $F_v/F_m$ ) как ответная реакция клетки на световое воздействие. Фотоингибирование РЦ в этот период носит все еще обратимый характер, а клетки сохраняют свою жизнеспособность. Однако при дальнейшем освещении (после 20 мин) клетки уже не справляются с фотоингибированием, и происходит накопление продуктов ПОЛ, что видно по росту термолюминесценции хлорофилла. Именно в этот период и происходит гибель клеток.

Таким образом, обратимое падение активности РЦ происходит до появления продуктов ПОЛ и не сопровождается гибелью самих клеток. Падение эффективности первичных стадий фотосинтеза носит регуляторный характер и представляет собой защитную адаптивную реакцию клетки на начальных этапах повышенного освещения.

#### 6.19.6. Методы оценки спектральной эффективности действия видимого излучения на растения.

Для исследования флуоресценции фитопланктона в природных водоемах разрабатывают специальную аппаратуру. Например, на кафедре биофизики биологического факультета МГУ разработан погружной зонд-флуориметр, позволяющий проводить измерение величин  $F_0$  и  $F_m$  в водоемах на разных глубинах (до 200 м). Принцип действия зонда представлен на [рис. 6.45](#). При освещении первой слабой вспышкой света порции фитопланктона в зонде измеряется величина фоновой флуоресценции  $F_0$ . Затем при действии второй мощной вспышки света в клетках происходит кратковременное насыщение всех РЦ, которые не успевают утилизировать поглощенную энергию света и переходят в результате этого в закрытое состояние. В этих условиях флуоресценция хлорофилла возрастает до максимальных значений  $F_m$ . Таким образом можно определить значения переменной флуоресценции



$F_v = F_m - F_0$  и отношение  $F_v/F_m$ , которые отражают эффективность запасаания энергии света на начальных этапах фотосинтеза.

Поскольку величина  $F_0$  зависит от количества хлорофилла в клетках, то это можно использовать для определения его концентрации. По величине  $F_0$  можно также определять и количество биомассы фитопланктона, которое пропорционально содержанию хлорофилла в клетках. Определение величин  $F_0$  и  $F_v/F_m$  позволяет выявить ситуации, когда в водоемах имеется много фитопланктона ( $F_0$  велико), однако его активность и продукция невелика из-за неблагоприятных условий. На основании этих данных можно получить сравнительную информацию о распределении как самого фитопланктона ( $F_0$ ), так и его фотосинтетической активности  $F_v/F_m$  по глубине и горизонтальным разрезам в водоемах и рассчитать фотосинтетическую продукцию. На [рис. 6.43](#) приведен профиль распределения фитопланктона и его активности по глубине.

Использование погружной аппаратуры для регистрации параметров люминесценции хлорофилла показало пространственную неоднородность распределения количества клеток и активности фотосинтеза в популяции фитопланктона. Во многих водоемах максимальная эффективность фотосинтетического аппарата не всегда совпадает с максимумом концентрации фитопланктона, однако коррелирует с обеспеченностью минеральным питанием фитопланктона. Например, в низкопродуктивных районах Тихого океана, Средиземного моря и озера Байкал значения  $F_v/F_m$  изменяются от 0,3 до 0,5–0,6. В более богатых водах Черного моря активность  $F_v/F_m$  возрастала до 0,6.

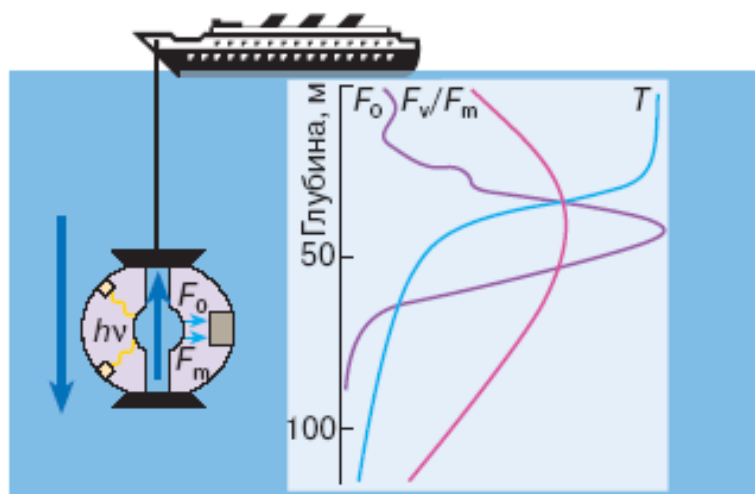


Рис. 6.45. Схема морского зондирования фитопланктона с использованием погружного двухимпульсного флуориметра

В сильно обогащенных водах северо-западного района Черного моря и залива Котор Адриатического моря активность фитопланктона была характерной для оптимальных условий. С глубиной активность фотосинтеза также меняется, достигая максимума на тех глубинах, где существует приток минеральных солей, а количество проникающего света еще достаточно для фотосинтеза (рис. 6.45). В тропических водах Тихого океана это наблюдается на глубине 80–120 м. Интересно, что увеличение активности фотосинтеза и появление клеток с высоким значением  $F_v/F_m$  предшествует периоду цветения, который сопровождается резким увеличением концентрации фитопланктона в водоемах. Это было обнаружено на озере Байкал и в северо-западном районе Черного моря.

Известно, что форма индукционных кривых флуоресценции, т. е. увеличение интенсивности флуоресценции после начала освещения (рис. 6.40), является совокупным результатом фотосинтетических процессов в мембранах фотосинтезирующих организмов. В популяции, как правило, могут присутствовать индивидуальные клетки, находящиеся в различных физиологических состояниях, которые связаны с различным уровнем фотосинтеза. Это проявляется в различном уровне флуоресценции, а также в различных формах индукционных кривых разгорания флуоресценции хлорофилла в этих клетках. С помощью микрофлуоресцентного микроскопа можно получить набор различных типов кривых индукции флуоресценции, снятых от одиночных клеток. Набор таких кривых может быть показателем гетерогенного состояния популяции в целом. С помощью статистических методов обработки таких кривых можно построить диаграммы состояния популяции и проследить динамику его изменения. Например, в природных условиях (Черное море) применение этого метода позволило выявить, как меняется гетерогенный состав популяций в районах с различным уровнем антропогенных загрязнений. Там, где условия наименее благоприятные, преобладают клетки с такими типами индукционных кривых, где имеется высокий уровень флуоресценции, что указывает на низкую эффективность использования света в фотосинтезе.

Итак, в обычных световых условиях в клетке устанавливается динамическое равновесие между процессом фотоингибирования РЦ с распадом  $D_1$ -белка и его ресинтезом. Под действием неблагоприятных факторов среды, низких концентраций антропогенных токсикантов (ионы тяжелых металлов, гербициды) замедляются репарационные процессы восстановления и ресинтеза белка РЦ, что приводит к уменьшению активности РЦ и снижению фотосинтетической продуктивности. Динамику этих репарационных процессов ресинтеза белка можно проследить по изменениям величины  $F_v/F_m$  при восстановлении активности фотосинтеза после действия повреждения. Это значит, что степень восстановления активности фотосинтеза по данным флуоресцентных методов может

использоваться в качестве интегрального показателя состояния процессов ресинтеза белка РЦ в клетках водорослей.

Представленный материал говорит о том, что функционирование РЦ фотосинтеза в природных условиях направленно изменяется под действием внешних факторов, и это непосредственно отражается на фотосинтетической продуктивности фитопланктона. Развитие флуоресцентных методов является перспективным для прогнозирования состояния и продуктивности планктонных сообществ в естественных водоемах, а их использование вносит существенный вклад в экологический мониторинг.

# **ГЛАВА 7. ДРУГИЕ ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ЯВЛЕНИЯ: ФОТОРЕЦЕПЦИЯ И ЗРЕНИЕ, ФОТОТРОПИЗМ И ФОТОТАКСИС, ФОТОМУТАГЕНЕЗ И ФОТОРЕПАРАЦИЯ ДНК. ПЕРСПЕКТИВЫ СОВРЕМЕННОЙ ФОТОБИОФИЗИКИ**

## **П л а н   г л а в ы**

### 7.1. Фоторецепция у различных видов организмов. Зрение.

7.1.1. Строение глаза, сетчатки и фоторецепторных клеток.

7.1.2. Молекулярные механизмы зрения.

7.1.3. Роль ионов кальция в регуляции зрительных сигнальных процессов.

### 7.2. Основные типы фоторегуляторных, физиологических и биохимических реакций у растительных и микробных организмов.

7.2.1. Фототаксис и фотокинез.

7.2.2. Фототропизм.

7.2.3. Фотоморфогенез.

7.2.4. Хронобиология и фотопериодизмы.

7.2.5. Фотобиосинтетические реакции.

7.2.6. Другие фотобиосинтетические реакции.

### 7.3. Повреждающее действие света на человека, животных и другие организмы.

7.3.1. Биологическое действие ультрафиолетового света.

7.3.2. Летальное действие ультрафиолетового света на микроорганизмы.

### 7.4. Механизмы рецепции света у высших растений.

7.4.1. Рецепция световых сигналов растениями.

7.4.2. Фоторецепция в красной области спектра: фитохромная система.

7.4.3. Фоторецепция в синей области спектра: криптохром и фототропин.

### 7.5. Фотохимические реакции в нуклеиновых кислотах, белках и липидах.

7.5.1. Действие ультрафиолетового света на нуклеиновые кислоты.

7.5.2. Действие ультрафиолетового света на белки.

7.5.3. Действие ультрафиолетового света на липиды.

### 7.6. Фотореактивация ДНК и фотодинамическая терапия.

7.6.1. Репарация ДНК и фотореактивация.

7.6.2. Пути усовершенствования фотохимиотерапии.



[7.7. Перспективы исследования роли электронно-возбужденных состояний в жизнедеятельности живых организмов](#)

[7.8. Основные проблемы и нерешенные задачи в фотобиофизике, возможные пути их прояснения.](#)

## 7.1. Фоторецепция у различных видов организмов. Зрение

Разнообразие приспособлений, с помощью которых живые существа воспринимают свет и зрительные образы, очень велико. Устройства для видения есть не только у высших животных, но и у низших многоклеточных и одноклеточных организмов. Так, на поверхности некоторых одноклеточных можно обнаружить прозрачные линзообразные зерна, способные к концентрированию света и иногда покрытые с внутренней стороны пигментом. Эти образования можно считать зачаточной формой глаз в животном мире. Низшие многоклеточные, например некоторые медузы, имеют светочувствительные органы, так называемые глазки, расположенные на наружной поверхности их чашеобразного тела. У беспозвоночных могут присутствовать также одиночные светочувствительные клетки, которые, к примеру, у дождевого червя весьма многочисленны и рассеяны в эпидермисе. У морских звезд, улиток и некоторых других организмов светочувствительные клетки собраны группами в углублениях кожи – зрительных ямках. Насекомые и ракообразные обладают фасеточными глазами, состоящими из многих глазков-трубочек. Глаз осьминога внешне и своим выражением похож на глаз человека.

Если у беспозвоночных можно обнаружить все типы глаз – от простых до наиболее совершенных, – то все позвоночные, начиная с рыб, имеют парные глаза, снабженные линзой-хрусталиком. В процессе эволюции хрусталик приобрел способность изменять свою кривизну в зависимости от удаленности рассматриваемых предметов, что дало возможность четкой фокусировки изображения на светочувствительном слое глаза. Кроме того, эволюционное совершенствование зрительного аппарата привело к более плотной упаковке зрительных (фоторецепторных) клеток в светочувствительном слое, что также улучшило качество изображения; развилась вращательная способность глаза, позволившая быстро находить и удерживать в поле зрения объект наблюдения; образовался зрачок – подвижная диафрагма, регулирующая количество поступающего внутрь

света; появились веки, защищающие глаз от повреждения и высыхания. В итоге сформировался сложно устроенный и совершенный зрительный орган человека и позвоночных животных.

### 7.1.1. Строение глаза, сетчатки и фоторецепторных клеток

**Глазное яблоко** (рис. 7.1) имеет неправильную шаровидную форму – спереди выпуклость сильнее выражена. Линия, соединяющая передний и задний полюсы глаза, называется осью глаза и соответствует его максимальному размеру (у человека в среднем 24 мм). В глазном яблоке выделяют две основные составляющие: ядро и капсулу.

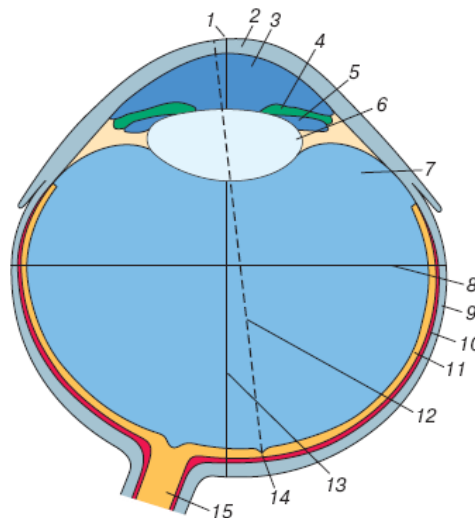


Рис. 7.1. Схема горизонтального разреза правого глаза человека: 1 – передний полюс глаза; 2 – роговица; 3 – передняя камера; 4 – радужная оболочка; 5 – задняя камера; 6 – хрусталик; 7 – стекловидное тело; 8 – экватор глаза; 9 – склера; 10 – сосудистая оболочка; 11 – сетчатка; 12 – зрительная ось; 13 – ось глаза; 14 – фовеа; 15 – зрительный нерв

Ядро глазного яблока включает хрусталик, водянистую влагу и стекловидное тело, которые прозрачны и в большей или меньшей степени способны преломлять свет. Хрусталик имеет вид двояковыпуклой линзы с большей кривизной задней поверхности. Вещество хрусталика, прозрачное и бесцветное, не содержит сосудов и нервов, снаружи оно облечено в бесструктурную прозрачную капсулу. Хрусталик прозрачен потому, что эпителиальные клетки, из которых он состоит, в процессе дифференцировки утратили свои органеллы и сохранили лишь некоторые продольно расположенные микротрубочки и скопления свободных рибосом.

Волокна хрусталика построены из характерного для них белка кристаллина. Водянистая влага представляет собой текучую прозрачную жидкость, близкую по своему составу плазме крови и содержащую некоторое количество гиалуроновой кислоты. Она заполняет пространство,



примыкающее к передней полусфере хрусталика, тогда как задняя его поверхность соприкасается со стекловидным телом. Стекловидное тело, на которое приходится основная масса глазного яблока, облечено в прозрачную бесструктурную оболочку и большей частью своей поверхности прилегает к сетчатке. Оно представляет собой прозрачное и аморфное вещество, состоящее из белка витреина и гиалуриновой кислоты.

Капсула глазного яблока (стенка глаза) включает в себя три слоя, по медицинской номенклатуре оболочки. Это (в направлении от периферии к центру глаза) наружный опорный, средний увеальный и внутренний сетчатый слои глазной капсулы.

Опорный слой охватывает глаз снаружи и состоит из двух отделов, склеры и роговицы, практически полностью облегающих глазное яблоко (первая сзади, вторая спереди), за исключением тех мест, где склере пронизывают кровеносные сосуды и зрительный нерв. Склера, или белочная оболочка, окрашена в белый цвет, непрозрачна, кровеносных сосудов имеет мало; то, что обычно называют белком глаза, и есть видимая снаружи часть склеры. Спереди склера резко меняет свою структуру и свойства и непосредственно переходит в роговицу, которая покрывает центральный участок глаза с его фронтальной стороны. Роговица, прозрачная и заметно выпуклая, состоит из плотной соединительной ткани и лишена кровеносных сосудов.

Увеальный слой, или увеа, богат пигментом и кровеносными сосудами, благодаря чему его также называют сосудистой оболочкой глаза. Этот слой в двух задних третях глаза представлен тонкой, имеющей бурый цвет собственно сосудистой оболочкой, которая сзади пронизана отверстием для зрительного нерва. Ближе к передней части глаза увеа утолщается, образуя так называемое цилиарное (ресничное) тело, расположенное в виде кольца в области перехода склеры в роговицу. Продолжаясь вперед, цилиарное тело переходит в радужную оболочку, или радужку, которая имеет форму фронтально поставленного диска с центральным отверстием, известным как зрачок. Диаметр зрачка изменяется в пределах 3–6 мм с помощью мышц, заложенных в соединительно-тканной основе радужки. Окраска радужки может варьировать (в зависимости от количества присутствующего в ней пигмента) от светло-серой и светло-голубой до темно-коричневой и почти черной. У альбиносов пигмент нацело отсутствует, так что радужка у них имеет красный цвет благодаря обилию кровеносных сосудов.

Сетчатая оболочка (сетчатка, или ретина) представляет собой по расположению самую внутреннюю, а для световосприятия – самую важную оболочку глаза, поэтому рассмотрим ее строение несколько подробнее.

**Сетчатка**, генетически и функционально составляющая единое целое со зрительным нервом, своей внутренней поверхностью граничит со стекловидным телом и снаружи прилегает к сосудистой оболочке. В передней части сетчатки, контактирующей с цилиарным телом, фоточувствительные элементы отсутствуют, тогда как в большей по размеру ее задней, собственно зрительной, части содержатся фоторецепторные

клетки, которые и обуславливают важнейшее свойство этого слоя – светочувствительность. Сетчатку иногда сравнивают со светочувствительным слоем фотопленки, хотя такое сравнение не совсем удачно: функция сетчатки (в отличие от фотопленки) не сводится лишь к восприятию света, уже на уровне сетчатки происходят анализ зрительной информации и выделение наиболее существенных элементов зрительных образов, например направления и скорости движения объекта, его величины. Зрительная часть сетчатки состоит из двух слоев, различимых микроскопически: пигментного слоя, прилегающего к внутренней поверхности сосудистой оболочки, и контактирующего со стекловидным телом нервного слоя сетчатки.

*Пигментный слой сетчатки* принято включать в ее состав, хотя он и не вовлекается в передачу зрительного сигнала и анатомически более тесно связан с сосудистой оболочкой, чем с нервным слоем сетчатки. В некоторых случаях, например даже при незначительном вытекании стекловидного тела в результате хирургического вмешательства, может происходить отслоение нервного слоя сетчатки от пигментного эпителия, приводящее к дегенерации ее нервных клеток. Пигментный слой получает питательные вещества из кровеносных сосудов средней оболочки глаза и обеспечивает потребности собственно фоточувствительных клеток. На клетках пигментного эпителия присутствуют микроворсинки, которые прилегают к фоторецепторным клеткам, но не связаны с ними. Микроворсинки играют важную роль в обновлении наружных сегментов фоторецепторных клеток, как бы sluшивая путем эндоцитоза самую крайнюю в данный момент часть фоторецептора. Кроме того, пигментный эпителий поглощает ту значительную часть попавшего в глаз света, которая, проходя через светочувствительный слой сетчатки, не поглотилась им. Здесь уместна аналогия между функциями пигментного эпителия и черного покрытия внутренней поверхности фотокамеры, состоящими в поглощении лишнего, рассеянного света.

*Нервный слой сетчатки* устроен очень сложно и, в свою очередь, состоит из девяти слоев, т. е. сетчатка в целом с учетом пигментного эпителия включает десять слоев. Следует заметить, однако, что не все они представляют собой истинные слои, которые могут быть физически отделены друг от друга, скорее это микроскопически различимые зоны, отличающиеся друг от друга составляющими элементами. Остановимся на самом важном элементе нервного слоя сетчатки – фоторецепторных клетках.

**Фоторецепторные клетки** (палочки и колбочки) представляют собой высокоспециализированные нейроны, выполняющие в сетчатке собственно сенсорную функцию. Палочек в сетчатке человека примерно 120 млн, причем расположены они преимущественно по периферии ее зрительной части. Колбочки (их около 7 млн на сетчатку) концентрируются в центральной ее зоне, особенно высока плотность колбочек в центральной ямке (фовеа). Палочки отвечают за сумеречное зрение при низкой освещенности, которое имеет малую разрешающую способность (остроту), и преобладают у животных, ведущих ночной образ жизни. Колбочки эффективно работают

при достаточно ярком освещении и обеспечивают цветное зрение, имеющее высокую остроту; соответственно их больше у животных, активных преимущественно днем.

Оба типа фоторецепторов – это длинные, узкие клетки, представляющие собой высокоспециализированные сенсорные нейроны, которые состоят из двух основных отделов: наружного и внутреннего сегментов (рис. 7.2).

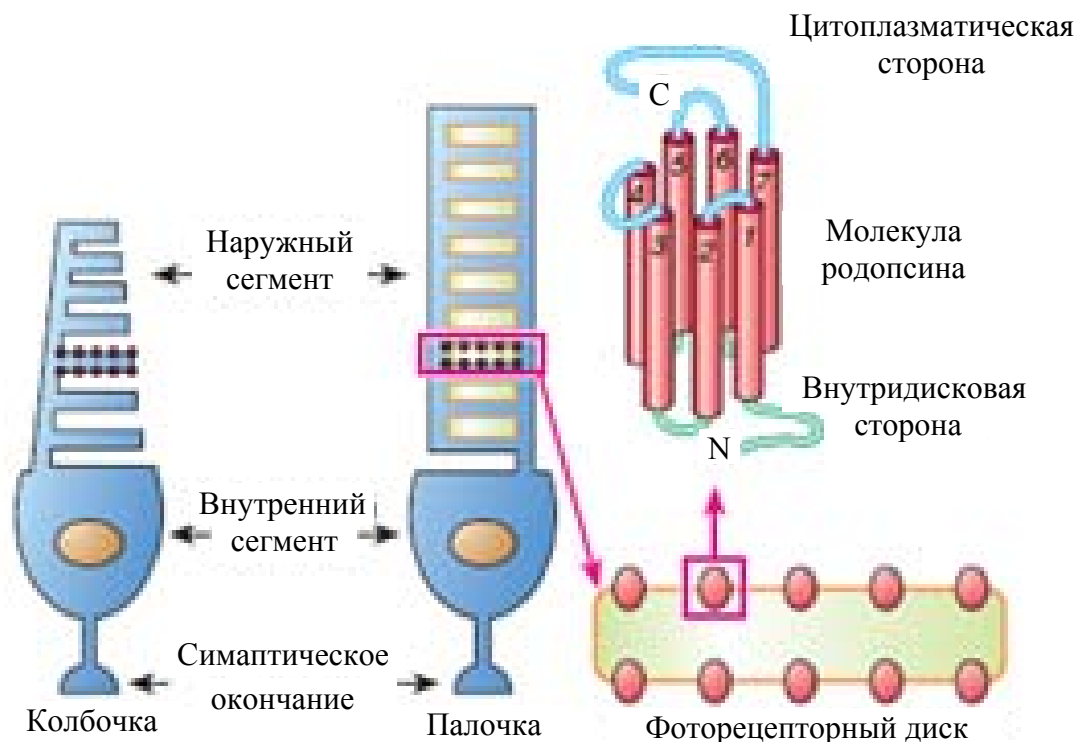


Рис. 7.2. Стоение колбочки и палочки (слева – общий вид, справа – вертикальный разрез фоторецепторного диска (внизу) и молекула родопсина (вверху))

Морфология наружного сегмента палочки (НСП) весьма своеобразна. НСП имеет цилиндрическую форму и по диаметру примерно соответствует внутреннему сегменту палочки. У человека диаметр НСП составляет 2 мкм, длина его равна 40–60 мкм, объем  $1,6 \cdot 10^{-13}$  л; у быка соответствующие параметры НСП составляют 2 мкм, 7–10 мкм,  $2,7 \cdot 10^{-14}$  л, у лягушки – 5–7 мкм, 35–50 мкм,  $1 \cdot 10^{-12}$  л. Существование тонкой перемычки между наружным и внутренним сегментами палочек оказалось счастливым обстоятельством, которое сильно облегчило исследование НСП. Дело в том, что НСП могут быть легко получены в довольно чистом виде с хорошим выходом после гомогенизации препаратов сетчатки в мягких условиях или путем их встряхивания. При этом происходит разрушение цилии, НСП отламываются от тела клетки, плазматическая мембрана в месте отрыва замыкается и образуется замкнутая структура, по строению и составу близкая, если не идентичная, исходным НСП, прикрепленным к телу клетки. Таким простым способом удастся избавиться от всех клеточных органелл

(ядра, митохондрий, рибосом), а значит, и от большей части белков, присутствующих в теле фоторецепторной клетки. Соответственно полученные препараты содержат преимущественно те структуры и белки, которые имеют более или менее прямое отношение к главной функции НСП как световой антенны и преобразователя светового сигнала в электрофизиологический ответ.

Хотя НСП не содержат обычных клеточных органелл, они обладают характерной структурой. Их можно уподобить замкнутому мешку, образованному внешней (плазматической) клеточной мембраной, в который помещена стопка из сотен или даже тысяч (в зависимости от вида животного) уплощенных замкнутых структур, называемых фоторецепторными дисками ([рис. 7.2](#)). Фоторецепторные диски образуются у основания НСП как выпячивание плазматической мембраны, причем внутреннее пространство вновь образованных дисков еще сообщается с внеклеточным пространством. Позднее диски как бы отпочковываются от плазматической мембраны, превращаясь в замкнутые структуры, и становятся независимыми как от нее, так и друг от друга. Тем самым наружная поверхность плазматической мембраны оказывается внутренней поверхностью дисков, а их просвет как бы ведет свое происхождение от внеклеточного пространства (заметим, что наружные сегменты колбочек по своему строению принципиально отличаются от НСП тем, что «колбочковые диски» представляют собой складки плазматической мембраны и их внутреннее пространство сообщается с внеклеточной средой). Если на поперечном разрезе диск выглядит как две параллельные мембраны, разделенные узким пространством и соединенные по краям, то в плане это действительно диск, хотя и не идеальной формы: его край имеет разрезы, или инциссуры, направленные от периферии к центру и придающие диску дольчатый вид. Глубина и число разрезов варьируют в зависимости от вида: у приматов и амфибий их более двух десятков, тогда как у грызунов присутствует только один глубокий разрез. Поскольку диски расположены друг над другом стопкой, то разрезы образуют как бы желобки, идущие вдоль НСП, и в этих желобках помещаются микротрубочки, берущие начало в аксонеме у основания наружного сегмента.

подавляющая часть мембран НСП – это мембраны фоторецепторных дисков, на плазматическую мембрану приходится всего лишь 1–5 % общей массы мембран НСП. Число фоторецепторных дисков на один наружный сегмент, как уже было сказано, может варьировать: в НСП человека их содержится около 1000, быка – 500, лягушки – 2000. Толщина мембраны дисков составляет 60–70 Е, расстояние между мембранными поверхностями в просвете диска 10–30 Е, зазор между дисками 150 Е.

Фоторецепторные клетки, будучи нейронами, подчиняются известному правилу, гласящему, что нервные клетки не восстанавливаются. Однако это правило не распространяется на палочковые диски, которые в течение всей жизни претерпевают непрерывное обновление, происходящее следующим образом. По мере образования у основания НСП и отпочковывания от

плазматической мембраны фоторецепторные диски постепенно перемещаются в направлении верхушки сегмента. Одновременно на их место приходят новые диски, поступающие со стороны цилии. В конечном счете, старые диски отшелушиваются с конца НСП, фагоцитируются клетками пигментного эпителия, после чего деградируют под действием его лизосомальной системы. Процесс обновления фоторецепторных дисков происходит непрерывно и с высокой скоростью. Так, у лягушек ежедневно обновляется до 80 дисков на НСП, что соответствует биосинтезу порядка  $6 \times 10^7$  молекул зрительного пигмента родопсина в день на палочку и что сравнимо со скоростью образования иммуноглобулинов в клетках крови. Интересно, что скорость обновления фоторецепторных дисков непостоянна в течение суток. Например, у крыс она резко ускоряется в течение 0,5–2 часов после рассвета, а спустя еще 1–2 часа возвращается к фоновому уровню, причем этот ритм сохраняется при длительном содержании животных в темноте. Напротив, при 24-часовом искусственном световом дне отшелушивание дисков подавляется, хотя достаточно всего лишь 2 часов темноты, чтобы нормальный ритм их обновления вновь восстановился.

**Состав НСП** также необычен. Фоторецепторные диски – главный структурный элемент НСП – построены почти исключительно из белков и липидов (около 60 и 40 % общей массы мембран соответственно). Углеводов в НСП немного – лишь 4 % их общего сухого веса. В цитоплазме НСП, заполняющей узкие просветы между дисковыми мембранами и зазоры между внешними краями дисков и плазматической мембраной, главный компонент – это белки.

*Липидный состав фоторецепторных мембран* характеризуется малым количеством холестерина и большим содержанием двойных связей, что в совокупности обуславливает низкую вязкость и высокую лабильность этих мембран. Тем не менее их состав даже более консервативен, чем у менее текучих биологических мембран из некоторых жизненно важных органов. Так, например, у крыс на диете с низким содержанием незаменимых жирных кислот – предшественников мембранных липидов – жирнокислотный состав мембран сердца и почек через определенный период времени начинает изменяться, что приводит к различным функциональным нарушениям. В то же время жирнокислотный состав элементов сетчатки не затрагивается, и зрительная функция сохраняется, что называется «до последнего».

*Белковый состав НСП* уникален. В зависимости от поведения белков в гипотонической среде (в растворе с концентрацией соли около 10 ммоль) они разделяются на интегральные мембранные и экстрагируемые. Интегральные мембранные белки НСП остаются в связанном с мембранами состоянии даже после их интенсивной экстракции. Таких белков около 70 % (общего количества белков в НСП), причем их основная доля – около 95 % – приходится на зрительный пигмент родопсин. Именно родопсин, будучи непосредственным рецептором света, обеспечивает восприятие светового кванта и дальнейшую передачу сигнала через специальную систему белков. Средняя концентрация родопсина в НСП находится в пределах 0,1–1,0 ммоль



в зависимости от вида животного, что на много порядков выше, чем концентрация всех других белковых рецепторов в мембранах клеток, отличных от фоторецепторных. Экстрагируемые белки НСП проигрывают интегральным мембранным белкам по общей массе, зато они намного богаче по номенклатуре: первых в НСП порядка 70 типов, вторых, включая родопсин, немногим более 10. Больше всего в экстрагируемой фракции *G*-белка трансдуцина, количество которого примерно в 10 раз меньше по сравнению с родопсином. Далее следует белок аррестин – его в НСП в несколько раз меньше, чем трансдуцина. Еще несколько белков представлено в 10–100 раз меньшем количестве, чем трансдуцин. Среди них функционально наиболее важные – фосфодиэстераза циклического *GMP* (*cGMP*-фосфодиэстераза), родопсинкиназа, гуанилил-циклаза, рековерин и активатор гуанилилциклазы.

Именно интегральный мембранный рецептор родопсин и названные выше экстрагируемые белки служат компонентами молекулярной машины, обеспечивающей в НСП восприятие, передачу, усиление, регуляцию и выключение зрительного сигнала.

**Феноменология зрения на уровне палочки сетчатки.** Палочки сетчатки функционируют в условиях неяркого освещения, к примеру в сумерках, отвечая изменением мембранного потенциала на идущий через них поток фотонов. Но они способны работать и в режиме счетчика квантов: единственный квант света может вызвать электрофизиологический ответ, величина которого до определенного предела линейно возрастает пропорционально числу поглощенных палочкой фотонов. При достаточно ярком и продолжительном освещении, напротив, наступает световая адаптация фоторецепторных клеток, которая выражается в снижении их чувствительности, тем больше, чем дольше действовал на них свет и чем ярче он был.

Теперь немного об электрофизиологических событиях, происходящих в НСП после поглощения палочкой светового кванта (рис. 7.3). В плазматической мембране НСП локализованы катионные каналы, через которые из внеклеточного пространства в цитоплазму НСП могут входить катионы натрия и в меньшем количестве кальция. В цитоплазме НСП присутствует циклический нуклеотид *cGMP*, выполняющий в фоторецепторных клетках функцию вторичного сигнала, причем его цитоплазматический уровень, высокий в темноте, резко снижается после освещения палочек. Важнейшее свойство *cGMP* состоит в его способности взаимодействовать с упомянутыми каналами и держать их в открытом состоянии. Поэтому в темноте, когда *cGMP* в цитоплазме НСП много, катионные каналы открыты. На свету, когда цитоплазматический уровень *cGMP* низок, нуклеотид диссоциирует из комплекса с каналами, они закрываются, и входящий через них катионный ток прекращается – плазматическая мембрана НСП становится более отрицательно заряженной, чем в темноте. Это изменение мембранного потенциала, называемое гиперполяризацией, отличает фоторецепторные клетки от других нейронов,



которые при возбуждении деполяризуются, т. е. потенциал на их мембране после действия стимула становится менее отрицательным. Гиперполяризация мембраны НСП представляет собой первый этап электрофизиологического ответа палочки, который сопровождается затем снижением секреции нейротрансмиттера из ее аксона в синаптическую щель и последующей передачей возбуждения к нейронам более высокого порядка.

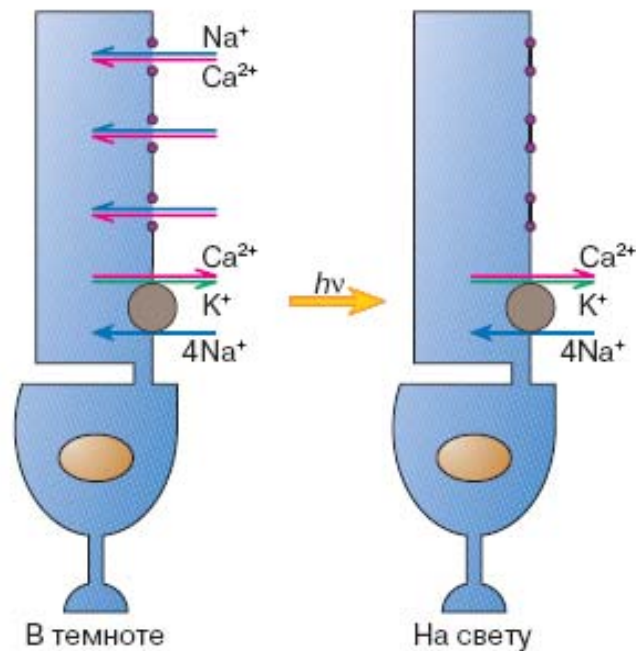


Рис. 7.3. Схема ионных токов в НСП в темноте и после действия света

Падение концентрации *cGMP* в цитоплазме НСП – центральное биохимическое событие, сопровождающее световое воздействие на палочку сетчатки. Еще одно важное последствие этого воздействия – падение цитоплазматической концентрации ионов кальция, обусловленное следующими обстоятельствами. В мембране НСП помимо уже упоминавшихся катионных каналов присутствует  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -обменник, откачивающий из цитоплазмы избыток  $\text{Ca}^{2+}$ , высокие концентрации которого опасны для клетки, в обмен на менее вредный  $\text{Na}^+$ . Этот обменник светонезависим, поэтому он продолжает откачивать  $\text{Ca}^{2+}$  еще некоторое время спустя после вызванного светом падения цитоплазматического уровня *cGMP* и закрывания катионных каналов. Значит, откачивание ионов кальция из НСП продолжается на фоне прекращения их входа, что и приводит к заметному падению цитоплазматической концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , что, в свою очередь, служит сигналом для запуска процессов, возвращающих фоторецепторную клетку из фотовозбужденного состояния в исходное темновое.

## 7.1.2. Молекулярные механизмы зрения

В большинстве работ, описывающих общую картину молекулярных механизмов зрения, за основу берут относительно простую ситуацию, соответствующую поглощению единичного фотона. И ясно почему: изучение и понимание комплекса биохимических и электрофизиологических процессов, происходящих в НСП при постоянном освещении, во много крат сложнее, чем при одноразовом срабатывании зрительной молекулярной машины. По этой причине, например, до сих пор не установлены молекулярные механизмы световой адаптации фоторецепторных клеток, хотя феноменология этого явления изучена и описана в деталях.

*Передача зрительного сигнала в НСП (рис. 7.4)* происходит при участии нескольких последовательно взаимодействующих между собой белков: зрительного пигмента родопсина, *G*-белка трансдуцина (обычно обозначаемого как *Gt*) и *cGMP*-фосфодиэстеразы, которые в совокупности образуют зрительный, или фосфодиэстеразный, каскад фоторецепторных клеток. На рис. 7.4 индекс в виде звездочки означает, что соответствующий компонент каскада находится в включенном состоянии. Стрелки демонстрируют пути активации компонентов и пути их выключения. Внизу схематически показаны катионные каналы в мембране НСП. Они открыты при высоком уровне *cGMP* в цитоплазме НСП, что соответствует темновому состоянию палочки сетчатки, и закрыты на свету, когда *cGMP*-фосфодиэстераза активирована и интенсивно гидролизует *cGMP* до *GMP*.

*Родопсин* (молекулярная масса около 40 кДа) выполняет в НСП роль акцептора фотона. Его молекула состоит из двух компонентов: белковой части – опсина, – на которую приходится основная часть общей массы молекулы, и 11-*цис*-ретиная – производного витамина А, – собственно и служащего ловушкой для фотона. Родопсин представляет собой интегральный мембранный белок, который не может быть извлечен из фоторецепторной мембраны кроме как путем ее разрушения. Единственная полипептидная цепь родопсина семь раз пересекает мембрану так, что ее гидрофильный *N*-конец обращен внутрь диска, а *C*-конец, тоже гидрофильный, – в цитоплазму. Кроме того, во внутридисковое и цитоплазматическое пространство экспонированы по три гидрофильных фрагмента или петли, которые соединяют между собой гидрофобные тяжи, пересекающие дисковую мембрану (см. рис. 7.2). К седьмому (считая от *N*-конца) гидрофобному тяжу ковалентно присоединен 11-*цис*-ретинаяль, который, поглотив фотон, изомеризуется в *транс*-ретинаяль, и эта изомеризация инициирует изменения в пространственной структуре молекулы опсина. В частности, его третья цитоплазматическая петля приобретает способность взаимодействовать со

следующим компонентом каскада – трансдуцином *Gt*.

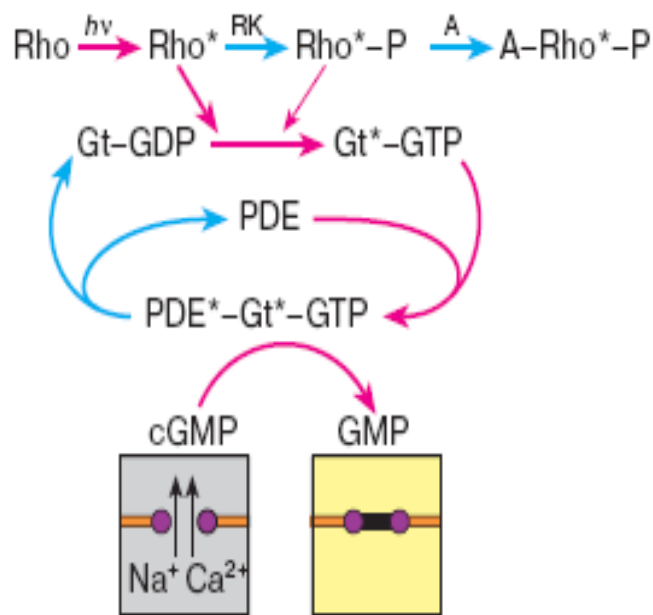


Рис. 7.4. Активация и выключение компонентов зрительного каскада родопсин (*Rho*) → трансдуцин (*Gt*) → *cGMP*-фосфодиэстераза (*PDE*):

*RK* – родопсинкиназа, *P* – фосфатный остаток, *A* – аррестин

*Трансдуцин* представляет собой типичный гетеротримерный *G*-белок, важнейшие характеристики которого – присутствие на его *α*-субъединице высокоспецифичного центра связывания для гуаниловых нуклеотидов (*GTP* и *GDP*) и его собственная ГТФ-азная активность. Последняя обеспечивает отщепление концевого фосфата от связанного с трансдуцином *GTP* таким образом, что образовавшийся *GDP* остается в нуклеотидсвязывающем центре *Gt*.

*cGMP*-фосфодиэстераза, третий и последний компонент зрительного каскада, обладает способностью с высокой эффективностью гидролизовать *cGMP*, который выполняет в фоторецепторных клетках функцию вторичного сигнала. Молекула *cGMP*-фосфодиэстеразы – это *α*<sub>2</sub>-гетеротетрамер, в котором *αβ*-субъединицы несут на себе активный центр фермента, а *γ*-субъединица служит внутренним ингибитором ферментативной активности *αβ*-субъединиц. Так что, когда все субъединицы *cGMP*-фосфодиэстеразы объединены в единый комплекс, то она каталитически неактивна. После удаления ингибиторной *γ*-субъединицы из комплекса остающиеся *αβ*-субъединицы начинают с высокой скоростью гидролизовать *cGMP* до линейного *GMP*, который сигнальной молекулой не является.

Как перечисленные компоненты фосфодиэстеразного каскада передают зрительный сигнал? Поглощение кванта света молекулой родопсина придает ей способность взаимодействовать со следующим компонентом каскада – трансдуцином. После взаимодействия с фотовозбужденным родопсином *Gt*,

который в неактивированном состоянии содержит прочно связанный *GDP*, обменивает его на присутствующий в цитоплазме *GTP*. В результате *Gt-GDP* переходит в *GTP*-содержащую форму (*Gt-GTP*), которая и есть активированная форма трансдуцина. Таким образом, первый этап передачи сигнала в зрительном каскаде состоит в катализе фотовозбужденным родопсином *GDP/GTP*-обмена на трансдуцине. На втором и последнем этапе каскада именно *Gt-GTP*, но не *Gt-GDP* взаимодействует с гетеротетрамерной, неактивной формой *cGMP*-фосфодиэстеразы, образуя комплекс с ее ингибиторной *g*-субъединицей и освобождая каталитические *ab*-субъединицы фермента от ингибирования, что и делает их способными гидролизовать *cGMP*.

Описанием фосфодиэстеразного каскада мы заполнили «черный ящик» между актом поглощения света и падением цитоплазматического уровня *cGMP*, служащего причиной закрывания катионных каналов в плазматической мембране НСП и ее гиперполяризации.

Необходимо добавить, что фосфодиэстеразный каскад не просто передает зрительный сигнал, но к тому же многократно усиливает его. Дело в том, что за время фоторецепторного ответа, равное примерно 1 секунде, молекула фотовозбужденного родопсина успевает проактивировать несколько сот молекул *Gt*, тем самым на первом этапе фосфодиэстеразного каскада сигнал усиливается в  $10^2$ – $10^3$  раз. На втором этапе каскада каждая активированная молекула *Gt* активирует лишь одну молекулу *cGMP*-фосфодиэстеразы, зато последняя катализирует гидролиз до 3000 молекул *cGMP* в секунду – сигнал усиливается еще в  $10^3$  раз. Следовательно, при прохождении зрительного сигнала через фосфодиэстеразный каскад – от фотона до *cGMP* – может происходить 100 000-кратное (и даже большее!) его усиление.

Выключение зрительного сигнала (рис. 7.4) – необходимая составляющая ответа фоторецепторных клеток на световой стимул: если возникший сигнал не будет своевременно выключен, то, образно говоря, глаз будет продолжать видеть свет, который уже погас. Чтобы этого не происходило, в фоторецепторных клетках функционируют специальные механизмы, переводящие активированные компоненты фосфодиэстеразного каскада в исходное, неактивированное состояние.

Выключение родопсина достигается путем его фосфорилирования под действием родопсинкиназы, которая катализирует ковалентное присоединение к опсину фосфатного остатка (остатков), отщепляя его от присутствующего в цитоплазме *ATP*. По данным, полученным *in vitro*, чем больше фосфатных остатков включено в молекулу родопсина, тем ниже его эффективность как активатора фосфодиэстеразного каскада. Следовательно, на уровне родопсина может происходить не просто выключение сигнала, но и его постепенное ослабление (аттенюация) по мере возрастания степени фосфорилирования зрительного пигмента.

Здесь мы должны вспомнить о том, что концентрация ионов кальция в

цитоплазме НСП высокая в темноте, падает на свету. Как оказалось, фоторецепторный  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающий белок рековерин ингибирует родопсинкиназу при высоком цитоплазматическом уровне  $\text{Ca}^{2+}$  и не действует на нее при низких концентрациях катиона. Следовательно, в темноте родопсинкиназа находится в комплексе с рековерином и не работает, тогда как после передачи зрительного сигнала, когда уровень  $\text{Ca}^{2+}$  снижается, этот комплекс диссоциирует, и киназа начинает фосфорилировать родопсин, тем самым выключая его. Кроме того, в НСП найден белок аррестин, который прочно связывается с родопсином при условии, что тот фосфорилирован. Образование комплекса между фосфорилированным родопсином и аррестином означает полное прекращение передачи сигнала от родопсина к трансдуцину вне зависимости от числа фосфатных остатков, перенесенных родопсинкиназой на опсин.

*Выключение трансдуцина и cGMP-фосфодиэстеразы* начинается с гидролиза *GTP*, связанного с *Gt*, до *GDP* под действием собственной *GT*-фазной активности трансдуцина. *g*-Субъединица *cGMP*-фосфодиэстеразы во время передачи зрительного сигнала находится в комплексе с *Gt-GTP*, но после гидролиза *GTP* и образования *Gt-GDP* этот комплекс диссоциирует. Освободившаяся ингибиторная *g*-субъединица возвращается к каталитическим *ab*-субъединицам *cGMP*-фосфодиэстеразы – гидролиз *cGMP* прекращается и каскад оказывается полностью выключенным.

*Восстановление темнового уровня cGMP*, который оказался сниженным после передачи сигнала через фосфодиэстеразный каскад, – еще одно событие, которое должно произойти, чтобы фоторецепторная клетка вернулась к темновому состоянию. Синтез *cGMP* катализирует фермент гуанилилциклаза, которая, как и родопсинкиназа, заингибирована при высоких концентрациях ионов кальция и активна, когда кальция в среде мало (гуанилилциклазе чувствительность к ионам кальция придает еще один фоторецепторный  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающий белок, который так и называется – активаторный белок гуанилилциклазы). Следовательно, в темновых условиях, что соответствует высокой концентрации кальция в цитоплазме НСП, синтез *cGMP*, катализируемый гуанилилциклазой, идет с низкой скоростью. На свету при низкой концентрации катиона синтез *cGMP* ускоряется и его уровень возрастает.

Теперь, когда все компоненты фосфодиэстеразного каскада выключены и цитоплазматическая концентрация *cGMP* возросла, фоторецепторная клетка полностью вернулась к исходному, невозбужденному состоянию, в котором она находилась до действия светового стимула, и вновь готова ответить на следующий квант света.



### 7.1.3. Роль ионов кальция в регуляции зрительных сигнальных процессов

**Роль  $\text{Ca}^{2+}$  в переходе фоторецепторной клетки в темновое состояние.** Необходимо подчеркнуть, что фоторецепторные диски, а значит, и присутствующий в них родопсин не контактируют с плазматической мембраной и локализованными в ней катионными каналами. Следовательно, должен существовать специальный механизм, который обеспечивает передачу зрительного сигнала от фотовозбужденного родопсина через зазор между фоторецепторными дисками и плазматической мембраной к катионным каналам.

Вопрос о механизме этой передачи, или зрительной трансдукции, оставался открытым в течение длительного времени – примерно с начала 1970-х до середины 1980-х годов. Основными претендентами на роль медиаторов внешнего сигнала в фоторецепторной клетке были в равной степени циклический гуанозинмонофосфат (*cGMP*) и ионы кальция. С открытием в 1985 году способности *cGMP* прямо связываться с катионными каналами, присутствующими в плазматической мембране НСП, и поддерживать их в открытом состоянии победу одержал этот циклический нуклеотид. И сегодня общепринято, что зрительный сигнал в пределах НСП передается с помощью каскада родопсин  $\rightarrow$  трансдуцин  $\rightarrow$  *cGMP*-фосфодиэстераза. Последняя представляет собой фермент, который, будучи в активированном состоянии (а это происходит при передаче сигнала в каскаде), гидролизует *cGMP* и снижает его цитоплазматическую концентрацию, что и приводит к закрыванию катионных каналов и соответственно гиперполяризации плазматической мембраны НСП. Иными словами, *cGMP* выполняет в зрительных клетках функцию вторичного посредника, или мессенжера.

Проиграв в споре с *cGMP* в качестве претендента на роль вторичного мессенжера,  $\text{Ca}^{2+}$ , однако, взял реванш как сигнал для перехода фоторецепторной клетки из возбужденного в исходное темновое состояние, иначе для завершения зрительного ответа на уровне НСП. (Далее ввиду отсутствия иного обозначения будем называть этот переход релаксацией, что соответствует используемому в англоязычной литературе термину *recovery*). Дело в том, что в плазматической мембране НСП присутствует свето- и потенциалнезависимый  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -обменник, который продолжает работать и откачивать  $\text{Ca}^{2+}$  из НСП наружу после вызванных светом падения цитоплазматического уровня *cGMP*, закрывания катионных каналов и прекращения входа  $\text{Ca}^{2+}$  в НСП. В результате спустя некоторое время после закрывания катионных каналов концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме НСП также снижается, и именно это снижение запускает большинство процессов, обеспечивающих релаксацию фоторецепторной клетки из возбужденного в исходное темновое состояние, в котором она находилась до поглощения кванта света родопсином.



В реальных условиях через фоторецепторную клетку проходит поток фотонов, каждый из которых вызывает единичное срабатывание зрительной сигнальной машины, состоящее из двух основных событий. Первое из них – передача светового сигнала через каскад родопсин → трансдуцин → *cGMP*-фосфодиэстераза, вызывающая гиперполяризацию плазматической мембраны НСП; второе – последующая релаксация фоторецепторной клетки к темновому состоянию. В свою очередь, процесс релаксации складывается из: а) перехода активированных компонентов зрительного каскада в исходное неактивированное состояние (назовем этот переход выключением) как условия для готовности каскада к новому ответу на следующий световой квант и б) восстановления исходно высокого уровня *cGMP* в цитоплазме НСП как условия для открывания катионных каналов и деполяризации плазматической мембраны НСП.

**Ca<sup>2+</sup> и зрительный каскад.** Родопсин, видимо, единственный компонент каскада родопсин → трансдуцин → *cGMP*-фосфодиэстераза, чувствительный к действию Ca<sup>2+</sup>. Механизмы действия катиона на эффективность работы родопсина, однако, принципиально различны при передаче зрительного сигнала и его выключении.

*Передача зрительного сигнала.* Получены данные о том, что повышение концентрации Ca<sup>2+</sup> в цитоплазме НСП сопровождается увеличением количества активированного трансдуцина, образующегося в расчете на одно и то же количество фотовозбужденного родопсина. Механизм обнаруженного эффекта остается, однако, неустановленным. В частности, неясно, действует ли Ca<sup>2+</sup> на каталитическую активность фотовозбужденного родопсина (*Rho\**), или он увеличивает квантовый выход реакции темновой родопсин → *Rho\** при том, что усиление сигнала на стадии *Rho\** → трансдуцин остается неизменным. Видимо, эффект катиона направлен непосредственно на родопсин, а не опосредован каким-либо Ca<sup>2+</sup>-связывающим белком. Если это действительно так, то можно предположить, что зрительный родопсин позвоночных животных сам по себе обладает Ca<sup>2+</sup>-связывающими свойствами.

*Выключение зрительного сигнала.* Многочисленные данные говорят о возможном участии кальция в регуляции выключения зрительного каскада опять же на уровне родопсина. Однако в этом случае действие катиона не является прямым: оно направлено на Ca<sup>2+</sup>-связывающий белок рековерин, а через него на активность родопсинкиназы – фермента, катализирующего фосфорилирование родопсина и тем самым снижающего каталитическую эффективность зрительного рецептора.

**Ca<sup>2+</sup> и синтез *cGMP*.** Для того чтобы произошла релаксация палочки сетчатки из фотовозбужденного в темновое состояние, в плазме НСП в дополнение к выключению компонентов зрительного каскада должен быть восстановлен исходно высокий уровень *cGMP*. Последний синтезируется из *GTP* под действием чувствительной к ионам кальция гуанилилциклазы (или иначе гуанилатциклазы), активность которой возрастает при низких и соответственно падает при высоких концентрациях катиона. Эффект Ca<sup>2+</sup> на гуанилилциклазную активность опосредуют Ca<sup>2+</sup>-связывающие белки,

получившие название *GCAP* (от *guanylate cyclase activating protein*). В фоторецепторных клетках найдено два *GCAP*: *GCAP1* с молекулярной массой  $M_r$ , равной 21 К, и *GCAP2* ( $M_r = 24$  К), структура и свойства которых как энзимологических объектов мало изучены. Более того, нет единого мнения относительно их локализации и возможного участия в зрительном ответе. Согласно одной точке зрения, в НСП локализован (преимущественно или исключительно) *GCAP1*, который и обеспечивает восстановление темнового уровня *cGMP* в цитоплазме НСП после передачи зрительного сигнала, тогда как *GCAP2* сосредоточен в структурах сетчатки, отличных от НСП, и прямого отношения к зрительному ответу не имеет. Согласно другой точке зрения, возможно, что оба *GCAP* функционируют в НСП, действуя как активаторы гуанилилциклазы и тем самым участвуя в релаксации фотовозбужденной палочки. Последние данные говорят о том, что *GCAP1* присутствует по большей части в наружных сегментах колбочек и во много меньшей степени в НСП, в то время как *GCAP2* выявляется примерно одинаково и в колбочках и в палочках, причем как в наружных, так и во внутренних сегментах фоторецепторных клеток обоих типов.

Вне зависимости от того, какая из приведенных выше точек зрения верна, оба *GCAP* способны активировать гуанилилциклазу только при концентрациях  $[Ca^{2+}]_f$  свободного  $Ca^{2+}$ , не превышающих 250 нМ, что соответствует физиологическому уровню кальция в цитоплазме НСП. При более высоких значениях  $[Ca^{2+}]_f$  активация прекращается, и активность фермента падает.

Необходимо также упомянуть о присутствии в палочках сетчатки гуанилилциклазной активности, стимулируемой ионами кальция в микромолярном диапазоне. Хотя это, скорее всего, гуанилилциклаза, локализованная не в НСП, а во внутреннем сегменте палочек. В данном случае эффект  $Ca^{2+}$  на гуанилилциклазную активность опосредует белок *S-100 b*, принадлежащий к обширному семейству *S-100*  $Ca^{2+}$ -связывающих белков. Фоторецепторный *S-100 b* представляет собой короткий полипептид с молекулярной массой 6–7 К, который в неденатурирующих условиях образует олигомеры с  $M_r$  около 40 К. В настоящее время  $Ca^{2+}$ -связывающие белки, принадлежащие к семейству *S-100* белков, интенсивно исследуют, однако о их роли в фоторецепторной клетке известно совсем немного.

**Ca<sup>2+</sup>, катионные каналы и Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>-обменник.** Катионные каналы, локализованные в плазматической мембране НСП, изменяют свою проводимость светозависимым образом благодаря способности связывать *cGMP*, концентрация которого, как уже было сказано, зависит от функционального состояния фоторецепторной клетки. Дополнительная модуляция проводимости каналов, видимо, может происходить под действием ионов кальция при участии кальмодулина (кальмодулин –  $Ca^{2+}$ -связывающий белок, широко распространенный в клетках различных типов, в том числе он найден и в фоторецепторных клетках). Неясно, как действует

комплекс  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин при высокой концентрации  $cGMP$  (что соответствует темновому состоянию НСП), однако на фоне низкой концентрации  $cGMP$  (что соответствует состоянию НСП после освещения) комплекс  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин увеличивает чувствительность катионных каналов к малым изменениям уровня  $cGMP$ . А это означает, что падение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , сопровождающее передачу зрительного сигнала, должно приводить к диссоциации кальмодулина из комплекса с каналами и тем самым способствовать их открыванию по мере повышения уровня  $cGMP$  при переходе (релаксации) палочки от фотовозбужденного к темновому состоянию.

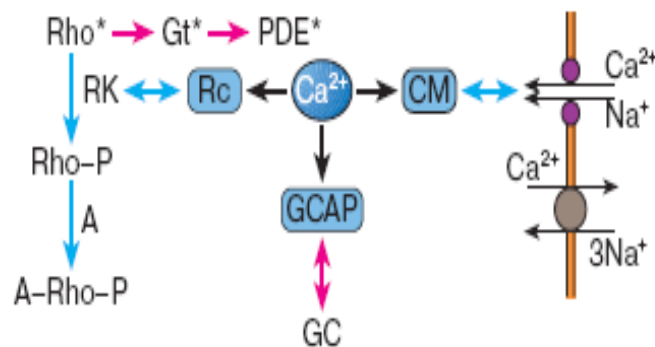


Рис. 7.5. Схема действия  $\text{Ca}^{2+}$  на релаксацию палочки:  $A$  – аррестин,  $CM$  – кальмодулин,  $GC$  – гуанилилциклаза,  $GCAP$  – активатор гуанилилциклазы,  $Gt$  – трансдуцин,  $PDE$  –  $cGMP$ -фосфодиэстераза,  $Rho$  – родопсин,  $Rho-P$  – фосфорилированный родопсин;  $Rc$  – рековерин,  $RK$  – родопсинкиназа, значком \* обозначено активированное состояние компонентов каскада  $Rho \rightarrow Gt \rightarrow PDE$

Нельзя, однако, исключить, что на самом деле эффект ионов кальция на катионные каналы, присутствующие в плазматической мембране НСП, опосредует не кальмодулин, а присутствующий в его препаратах неустановленный белковый фактор. Дело в том, что в экспериментах, выполненных, правда, на колбочках, а не на палочках, не удалось воспроизвести эффект  $\text{Ca}^{2+}$  на проводимость катионных каналов с использованием очищенного кальмодулина. Было высказано предположение, что, по крайней мере в колбочках, эффект ионов кальция на проводимость катионных каналов опосредован не кальмодулином, а каким-то другим неидентифицированным белком.

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -обменник представляет собой белок с молекулярной массой 215 К, локализованный в плазматической мембране НСП. Функция этого обменника состоит в откачивании наружу ионов кальция, входящих в цитоплазму НСП извне через открытые в темноте катионные каналы с тем, чтобы не допустить повышения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  внутри НСП сверх допустимого уровня. Однако на свету, когда каналы закрыты, работа обменника приводит к падению уровня  $\text{Ca}^{2+}$ , служащего, как уже было сказано, сигналом для запуска релаксации фотовозбужденной клетки к темновому состоянию. Когда величина  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  достигает примерно 100 нМ, обменник

становится неспособным к дальнейшему откачиванию  $\text{Ca}^{2+}$ . Сродство  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -обменника к ионам кальция регулируется каким-то цитоплазматическим фактором, возможно, протеинкиназой.

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -обменник – последний из известных в настоящее время  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительных компонентов зрительной сигнальной машины, итоговая схема которой и места действия в ней ионов кальция представлены на [рис. 7.5](#).

**Ca<sup>2+</sup>, реверин и регуляция зрительного ответа.** Фосфорилирование рецепторов, сопряженных с *G*-белками, под действием специфических протеинкиназ снижает их чувствительность к внешним сигналам (такое снижение чувствительности обозначают термином «десенситизация»). Родопсин как типичный представитель сопряженных с *G*-белками рецепторов ведет себя подобным же образом: его способность активировать трансдуцин (фоторецепторный *G*-белок) уменьшается по мере включения фосфатных остатков в *C*-концевой фрагмент молекулы фотовозбужденного родопсина. К настоящему времени получено большое количество экспериментальных данных о том, что активность родопсинкиназы – фермента, катализирующего фосфорилирование фотовозбужденного родопсина, – регулируется  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым образом белком реверином. При высокой концентрации ионов кальция родопсинкиназа находится в комплексе с реверином, который действует как ингибитор фермента, при низких концентрациях катиона комплекс родопсинкиназа – реверин диссоциирует и ингибирование снимается.

Реверин – первоначальное наименование «p26» – по величине его кажущейся молекулярной массы, равной 26 К) был впервые обнаружен как фоторецепторный белок, способный прочно связываться с родопсином, иммобилизованным (т. е. прочно присоединенным) к нерастворимому носителю. Первоначально полагали, что реверин  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым образом модулирует активность гуанилатциклазы, но позднее были получены данные, что мишенью для него в НСП, скорее всего, служит родопсинкиназа.

К *N*-концу реверина ковалентно присоединен остаток жирной миристиновой кислоты, который благодаря своей гидрофобности придает белку способность взаимодействовать с фоторецепторными мембранами, гидрофобными по своей природе. Реверин обладает тем замечательным свойством, что *in vitro* в суспензии фоторецепторных мембран при отсутствии ионов кальция он находится в растворимом состоянии, а в присутствии катиона переходит из раствора на мембрану. Такое поведение реверина обусловлено тем, что в бескальциевой среде его миристоилированный *N*-конец спрятан в так называемом гидрофобном кармане белковой молекулы. Связывание  $\text{Ca}^{2+}$  с реверином изменяет его конформацию таким образом, что миристоилированный *N*-конец белка экспонируется наружу и, погружаясь в липидный бислой фоторецепторной мембраны, заякоривает реверин ([рис. 7.6](#)). Этот механизм изменения распределения миристоилированного реверина между двумя фазами

(раствор – мембрана) благодаря присутствию ионов кальция получил название кальций-миристоильного переключателя (*calcium-myristoyl switch*).

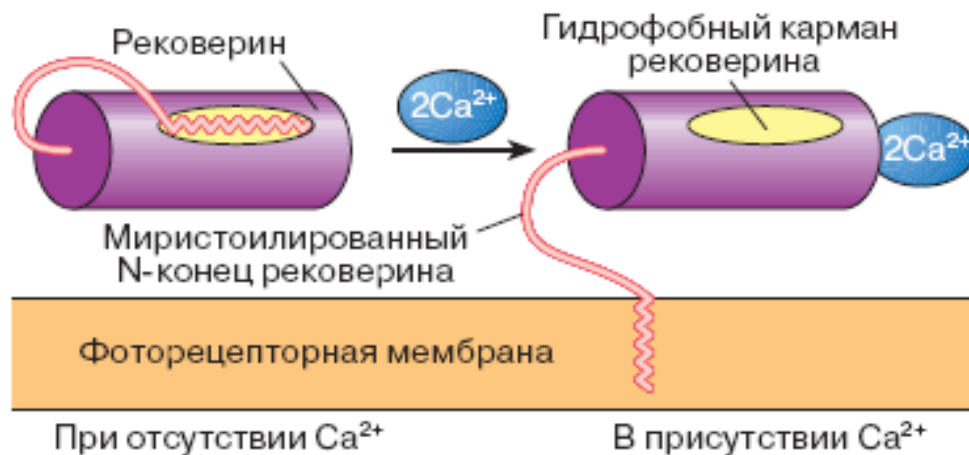


Рис. 7.6. Схема кальций-миристоилированного переключателя

Остается неясным, однако, как этот миристоильный переключатель работает (и работает ли он вообще) в условиях *in vivo*. Складывается впечатление, что не только родопсин, который интегрирован в фоторецепторную мембрану, но и другие компоненты зрительной молекулярной машины ([рис. 7.7](#)) работают в слое цитоплазмы, прилегающем к поверхности дисков, вне зависимости от функционального состояния палочки. Если это действительно так, то и рековерин оперирует в двумерном пространстве этого слоя, не выходя из него. Но в зависимости от функционального состояния палочки и соответственно концентрации ионов кальция в цитоплазме НСП рековерин может находиться в двух состояниях: либо в комплексе с родопсинкиназой, либо в свободном виде, причем в первом случае активность родопсинкиназы подавлена, а во втором – фермент активен и катализирует фосфорилирование родопсина.



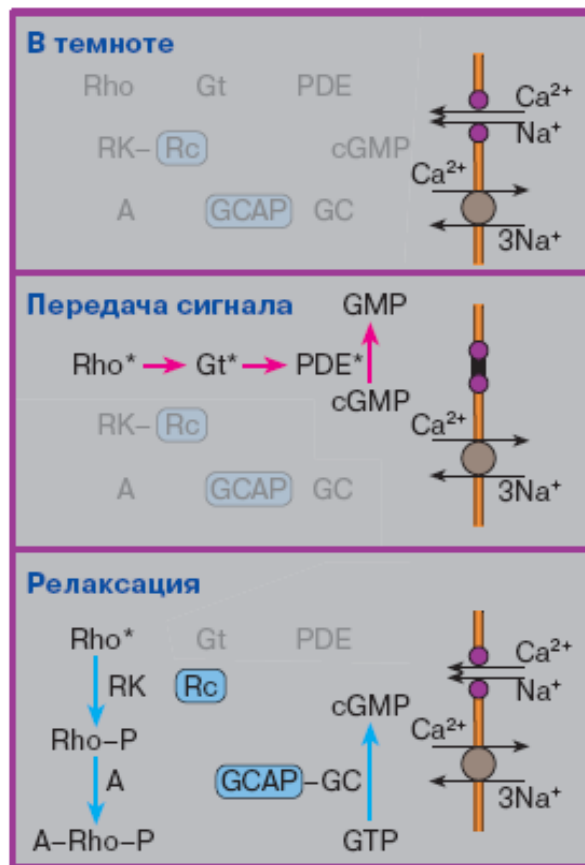


Рис. 7.7. Цикл работы зрительной молекулярной машины: темновое состояние → передача сигнала → релаксация

К настоящему времени в клетках нервной системы, отличных от фоторецепторных клеток, найдены родственные рековерину  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие белки, которые образуют семейство рековерина. Функция этих белков, однако, остается неизвестной, хотя по аналогии с рековерином можно предположить, что они участвуют в  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой регуляции фосфорилирования пока не установленных внутриклеточных мишеней.

С учетом всего сказанного и других известных данных можно предложить следующий гипотетический сценарий, подробно описывающий цикл работы зрительной молекулярной машины (рис. 7.7).

В темноте компоненты каскада родопсин → трансдуцин → *cGMP*-фосфодиэстераза выключены; уровень *cGMP* и  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме НСП высокий; родопсинкиназа, находящаяся в комплексе с рековерином, и гуанилилциклаза, свободная от *GCAP*, неактивны; катионные каналы в плазматической мембране НСП открыты, и мембрана деполяризована. Передача сигнала инициируется родопсином, который, поглотив квант света, переходит в фотовозбужденное состояние ( $\text{Rho}^*$ ) и передает сигнал по зрительному каскаду; активированная *cGMP*-фосфодиэстераза гидролизует *cGMP*, цитоплазматическая концентрация которого снижается; катионные каналы закрываются, вход  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  в НСП прекращается, и плазматическая мембрана палочки гиперполяризуется. Релаксация запускается падением цитоплазматического уровня  $\text{Ca}^{2+}$  (исключение составляют трансдуцин и



*cGMP*-фосфодиэстераза, которые выключаются с помощью  $\text{Ca}^{2+}$ -независимой ГТФ-азы трансдуцина): родопсинкиназа диссоциирует из комплекса с реверерином; свободная родопсинкиназа фосфорилирует фотовозбужденный родопсин, что снижает его эффективность как активатора зрительного каскада. Связывание аррестина с фосфорилированным *Rho\** приводит к его выключению и, в конечном счете, к прекращению передачи сигнала в каскаде; гуанилилциклаза активируется под действием *GCAP*; синтез *cGMP* ускоряется, и его концентрация в цитоплазме НСП возрастает (чему способствует прекращение гидролиза *cGMP*); кальмодулин диссоциирует из комплекса с канальными белками, что благоприятствует взаимодействию с ними *cGMP*.

Цикл завершается открыванием катионных каналов и повышением цитоплазматического уровня  $\text{Ca}^{2+}$ , что создает условия для ингибирования родопсинкиназы реверерином и прекращения активации гуанилилциклазы под действием *GCAP*.

## 7.2. Основные типы фоторегуляторных, физиологических и биохимических реакций у растительных и микробных организмов

Помимо зрения существует огромное количество физиологических проявлений и биохимических реакций, протекание которых зависит от света или регулируется светом. Основные типы таких проявлений и реакций приводятся и разбираются в настоящем параграфе.

### 7.2.1. Фототаксис и фотокинез

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. Тем не менее будут рассмотрены 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 тропотаксис, 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.

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.

Большое количество работ посвящено изучению молекулярных механизмов фототаксиса. По данным ряда исследователей, фототаксическая реакция у водорослей *Polytoma Wella* возникает вследствие быстрого уменьшения концентрации «макроэргов» в моторном аппарате клеток. Причиной этого может быть увеличение АТФ-азной активности. Подобная «энергетическая» точка зрения разделялась многими авторами. В частности, было обнаружено, что в ходе фототаксиса АТФ расходуется в значительно больших количествах, чем это необходимо для простого передвижения клеток. Предполагаются и другие механизмы индукции подвижности организмов.

Значительный интерес представляет также соотношение у водорослей таких процессов, как фотосинтез и фототаксис. На основании опытов по торможению фототаксиса у сине-зеленых водорослей ингибиторами фотосинтеза был сделан вывод, что процессы фотосинтеза и фототаксической активности взаимосвязаны.

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, а у *Cyanophyceae* – фикоцианин, у *Phormidium autumnale* – хлорофилл, а каротиноиды – у *Euglena*.

В спектре действия кинеза эвглены обнаруживаются два выраженных максимума: коротковолновый 460 нм и длинноволновый 640 нм (рис. 7.8, а). Первый из них приписывается каротиноидам, второй – хлорофиллу *a*.

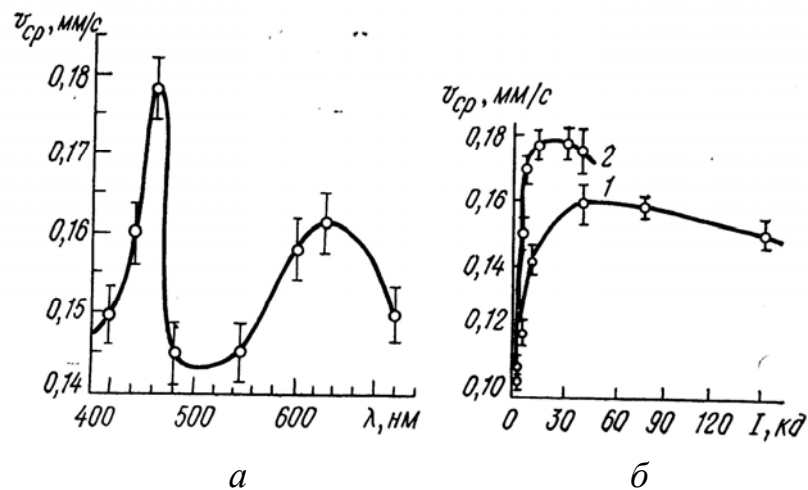


Рис. 7.8. Примеры фоторегуляции эвглени:  
а – спектр действия увеличения подвижности эвглени<sup>\*</sup>; б – зависимость подвижности эвглени от интенсивности неполяризованного (1) и поляризованного (2) света

Кривая зависимости скорости движения биообъектов имеет сложный характер. По данным Уолкена, у эвглени (рис. 7.8, б) 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 эвглени. 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 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.

### 7.2.2. 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

<sup>\*</sup> Wolken J., Shin E., 1958

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 coleoptilia овса. Выращенные в темноте проростки овса при освещении слабым «боковым» светом изгибаются по направлению к источнику. Угол изгиба пропорционален дозе ( $I t$ ) от 1 до 0,01 Дж/м<sup>2</sup> 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.

При высоких интенсивностях света у растений наблюдается отрицательный ответ.

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. 7.9](#), 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 кривой 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 и другими исследователями. Во всех случаях отмечалась одна и та же характерная кривая.

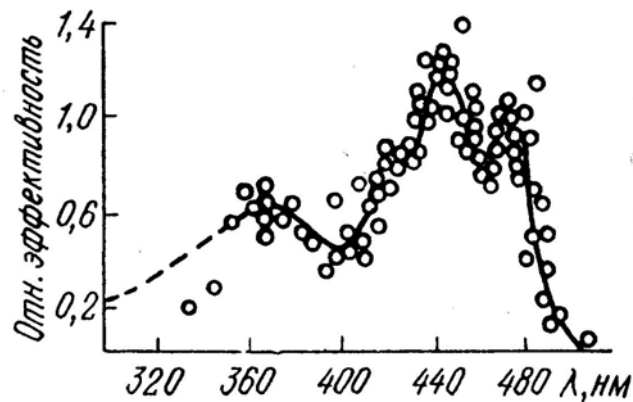


Рис. 7.9. Спектр действия первой положительной фототропной реакции проростков овса \*

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. В то же время гексановые экстракты каротиноидов вообще не поглощают при 370 нм. Исключение составляет *цис*-форма 9,9-моно-*p*-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. Характерная для спектров действия структурированность появляется в спектрах поглощения рибофлавина, если

\* Thimann K., Curry G., 1960



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, 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 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 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.

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.

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 сенсibilизированной флавинами деструкции ауксина, причинами возникновения бокового концентрационного градиента гормона роста могут быть подавление светом биосинтеза ауксина через инактивацию энзимов или кофакторов в биосинтетической цепи и нарушение 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 колеоптилей овса в агаровый акцептор удалось показать, что из затемненной половины проростка в агар диффундирует большое количество 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 Бриггса, концентрация ауксина в клетках затемненной стороны кончика колеоптиля 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 индолил-уксусную кислоту, меченую по углероду, показали возникновение бокового градиента метки при освещении колеоптилей кукурузы и овса.

Итак, свет реализует свое тропное действие через создание бокового градиента ауксинов, который обусловлен скорее всего изменением проницаемости клеточных мембран.

Как уже отмечалось, у высших и низших растений свет, приводящий к тропизму, поглощается одними теми же молекулярными акцепторами. Однако первичные фотохимические реакции и последующие усилительные механизмы фикомицетов вряд ли можно связывать с участием ауксинов. Так, содержание индолил-уксусной 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 усилительные 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 филаментов 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/м<sup>2</sup> с хаотически расположенными хромофорами; 2) для средних интенсивностей  $10^{-2}$ – $10^2$  Вт/м<sup>2</sup> с параллельной ориентацией хромофоров к поверхности клетки; 3) для высоких интенсивностей  $10^2$ – $10^3$  Вт/м<sup>2</sup> 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.

### 7.2.3. 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 семядолей, клеточное дыхание, накопление хлорофилла *c* 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 растения), 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.

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 название 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 ретикулумом, 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 молекулярной массой около 120000. В некоторых работах приводятся и другие значения: от 60000 до 240000, что может быть обусловлено процессами агрегации и дезагрегации субъединиц хромопротеида.

#### 7.2.4. 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.

**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 ортогенезе. 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.

По существу, остаются также не ясными молекулярные механизмы действия света на эндогенную ритмику.

**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 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.

**Фотопериодические реакции у животных.** Вся жизнедеятельность животных периодична. Ежедневно бодрствование сменяется сном, двигательная активность – покоем и т. д. Есть не только суточные, но и более длительные сезонные и годовые ритмы роста, размножения, запасания жира, линек, миграций и т. д. Внешними факторами, регулирующими эти ритмы, являются суточные и годовые колебания интенсивности света, температуры, уровня шумов и др. Однако периодичность освещения на протяжении всей эволюции является наиболее точно воспроизводимым внешним сигналом времени, поэтому в природных условиях именно режим освещения, соотношение длительности дня и ночи являются важнейшим синхронизатором суточных и годовых ритмов жизнедеятельности. В настоящее время фотопериодические реакции обнаружены в той или иной форме практически у всех видов животных, а также у человека.

Фотопериодическая регуляция ярко проявляется у многих диких млекопитающих, обитающих в высоких широтах и имеющих четкую сезонную периодичность размножения и поведения. Например, у овец и коз начало течки стимулируется коротким световым днем; у хорьков, зайцев, енотов, лошадей – длинным фотопериодом. Благодаря фотопериодической регуляции период течки у этих животных обычно приурочен так, что конец беременности приходится на благоприятный для роста потомства сезон. Фотопериодическая регуляция размножения ярко выражена у перелетных птиц. У них наблюдается ежегодный цикл развития половых желез,



включающий как полностью зрелую стадию, так и полную регрессию до состояния, не отличимого от неполовозрелых особей. Поместив таких птиц в специально подобранные условия освещения (с определенным соотношением длительностей дня и ночи, имитирующим весну или лето), можно заставить их, например, нестись в течение целого года или, напротив, вызвать регрессию половых желез. Можно индуцировать предшествующий перелету период накопления жира, линьку и т. д. Некоторые животные реагируют не только на дневной свет, но и на лунный. Широко известны уникально синхронизированные (с точностью до двух дней) лунные ритмы размножения многощетинковых червей палоло, обитающих на коралловых рифах Тихого океана. Аналогичным образом к определенным фазам луны приурочено размножение морских червей Бермудских островов *Odontosyllis*, которое происходит трижды в году. И каждый раз брачный обряд начинается около 8 часов вечера и продолжается всего около 30 минут. У человека и многих домашних животных фотопериодическая регуляция годовых циклов отсутствует. Но, тем не менее, фотопериодические эффекты обнаружены и у человека, хотя их биологическая значимость не вполне ясна.

*Гормоны как водители фотопериодических ритмов.* Биохимическим механизмом, лежащим в основе проявления фотопериодических эффектов на уровне целого организма, является изменение под действием света содержания в организме ряда гормонов. Важная роль эндокринной системы доказывается тремя группами фактов. Во-первых, хирургическое удаление некоторых желез внутренней секреции снимает фотопериодические реакции. Во-вторых, обнаружены зависимые от света процессы биосинтеза некоторых гормонов. В-третьих, экзогенное введение животным этих гормонов моделирует эффекты, вызываемые светом. Во многих случаях ключевая роль в фотопериодизме принадлежит эпифизу (шишковидной железе). Удаление эпифиза приводит к исчезновению фотопериодической регуляции гонад у хомячков, крыс, японского перепела, некоторых рыб. В эпифизе вырабатывается гормон мелатонин. Любопытно отметить, что мелатонин впервые был открыт в шишковидной железе млекопитающих, а свое название получил из-за того, что его добавление в воду вызывает сокращение меланофоров кожи головастика амфибий. При освещении содержание мелатонина в эпифизе уменьшается, а в темноте увеличивается. Зависимый от света ритм мелатонина прослежен у человека, ночью его концентрация в плазме бывает более чем в сто раз выше, чем днем. Мелатонин является водителем ритма других желез внутренней секреции, например надпочечников, гипофиза и др.

*Органы как рецепторы света при фотопериодической регуляции* существенно отличаются у разных животных. Так, у тлей это средняя часть мозга, расположенная между глазами. У рыб, амфибий, рептилий фоторецептором является непосредственно эпифиз, который представляет собой парный орган, выдающийся своей концевой частью назад. Последняя



часто располагается в специальном углублении черепа или даже через отверстие в черепе выпячивается наружу и контактирует непосредственно с кожей. Благодаря такому положению до эпифиза доходит много света, ослабляемого только кожей. Часто концевая часть эпифиза бывает окружена пигментированными клетками кожи, образующими ясно различимое темное пятно. Эта часть эпифиза содержит сенсорные клетки, гистологически напоминающие ретинальсодержащие клетки глаза. У птиц фоторецептор расположен в области гипоталамо-гипофизарного тракта. Эпифиз, вероятно, прямо не стимулируется светом и не служит фоторецептором, а подключается в регуляцию на темновых стадиях. У млекопитающих рецепторы света, отвечающие за фотопериодическую регуляцию, имеют иную природу – ими являются глаза. Таким образом, глаза участвуют не только в зрении, но и выполняют функцию фоторецепторов и в других процессах – фотопериодической регуляции.

Измерения спектров действия фотопериодизма показали, что у тлей и яблонной плодовой плодожорки наиболее эффективен синий свет и существенно менее эффективен зеленый, у личинок комара максимум спектра действия лежит в зеленой области. У насекомых на роль молекул-акцепторов света могут претендовать флавоноиды, гемопротеиды или каротиноиды, имеющие полосы поглощения в области длин волн 400–550 нм. Фотопериодическая регуляция онтогенеза птиц осуществляется преимущественно желто-красным светом. Это и понятно, так как до фоторецептора птиц, расположенного в мозгу, доходит практически только красный свет, и форма спектра действия определяется не только формой спектра поглощения молекул-хромофоров, но и пропусканием тканей головы.

### 7.2.5. Фотобиосинтетические реакции

К фотобиосинтетическим реакциям обычно относятся такие реакции синтеза биологических соединений, которые включают в себя не только ферментативные, но и ключевую световую стадии. 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.

**Синтез хлорофилла.** Для фотосинтезирующих организмов характерно постоянное обновление хлорофилла, включающее в себя как разрушение, так и синтез новых молекул пигмента. Исходные продукты для синтеза хлорофилла – аминокислота глицин и янтарная кислота, при взаимодействии которых образуется  $\alpha$ -амино- $\beta$ -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 представлен; в виде следующей схемы: глицин + сукцинил CoA  $\rightarrow$   $\alpha$ -амино- $\beta$ -кетoadипиновая кислота  $\rightarrow$   $\delta$ -аминолевулиновая кислота  $\rightarrow$  порфобилиноген  $\rightarrow$  уropopфориноген  $\rightarrow$  уropopфирин 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 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.

В растениях хлорофилл и его предшественники находятся в нековалентном комплексе с белковым носителем, получившим названия протохлорофиллид-, хлорофиллид- и хлорофилл-голохромов. 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.

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  $\delta$ -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.

Таким образом, в сложной цепи биосинтеза хлорофилла наряду с темповыми 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.

**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 каротиногенезом 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.

Свет не только индуцирует синтез каротиноидов, но и вызывает превращения одних форм каротиноидов в другие.

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 сотрудниками показано, однако, что дезэпоксидация может происходить и в аэробных условиях, но по другому механизму, чем при анаэробнозе: 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.

**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, 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.

**Синтез витамина 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 D<sub>2</sub> является эргокальциферол, D<sub>3</sub> (у животных) – холекальциферол, а D<sub>4</sub> – 2,2-дигидроэргостерол.

В темноте между стереоизомерами преэргокальциферолом (P) и эргокальциферолом (D) устанавливается термодинамическое равновесие. Облучение любого (E, T, L, P) из предшественников приводит, в конечном счете, к образованию эргокальциферола (витамина D<sub>2</sub>). При этом в ходе облучения между концентрациями продуктов устанавливается фотостационарное состояние.

### 7.2.6. Другие фотобиосинтетические реакции

**Загар.** Ультрафиолетовое излучение помимо эритемы вызывает гиперпигментацию кожи – загар. Загар является замедленным процессом и начинает развиваться в коже через 2–3 суток после облучения, достигает максимума на 13–21-й день и затем угасает за несколько месяцев. Спектр действия загара похож на спектр действия эритемы, т. е. наиболее эффективно опять же УФ-В-излучение. Ультрафиолетовое излучение запускает сложную цепь реакций биосинтеза меланина в специализированных клетках – меланоцитах.

Появление меланина в коже является важной защитной реакцией организма. В настоящее время установлено как минимум три механизма защитного действия меланина. Во-первых, меланин служит оптическим экраном, поглощающим ультрафиолетовый свет, таким образом он физически защищает клетки кожи от пагубного действия ультрафиолетового излучения. Другие два механизма – химические. Дело в том, что под действием ультрафиолетового облучения в коже образуются свободные радикалы, запускающие, в частности, цепные реакции пероксидного окисления липидов. Так вот, с одной стороны, меланин является эффективным перехватчиком свободных радикалов, и за счет этого он обрывает цепные реакции окисления. С другой стороны, меланин способен связывать (хелатировать) ионы двухвалентного железа. Роль ионов двухвалентного железа заключается в том, что они разрушают пероксиды с образованием свободных радикалов. Это приводит к разветвлению реакций цепного окисления. Хелатированное меланином железо уже не может участвовать в реакциях разветвления.

**Лечение желтухи новорожденных.** Синий свет используется в родильных домах для лечения желтухи новорожденных. Это заболевание является следствием резкого повышения в организме концентрации билирубина, придающего коже желтоватый оттенок. Билирубин образуется из гемоглобина постоянно у всех людей, из крови он устраняется при участии печени. У взрослых нормальное содержание билирубина в крови составляет 1 мг %, у новорожденных – 20 мг %. Это связано с тем, что в первые дни жизни наблюдается недостаток фермента глюкуронил-трансферазы, превращающего билирубин крови в водорастворимый конъюгат глюкуроновой кислоты. Билирубин плохо растворим в воде и хорошо – в жире, поэтому он в больших количествах откладывается в тканях мозга, что приводит к необратимым изменениям в центральной нервной системе, делающим человека неполноценным. Билирубин имеет максимум поглощения в синей области спектра. Он очень легко фотоизомеризуется, и продукты его изомеризации нетоксичны. Если новорожденных детей освещать синим светом, то фотоизомеризация билирубина с образованием водорастворимых фотопродуктов происходит прямо в кровеносных сосудах.



Таким способом фотохимически устраняют патологические последствия гипербилирубинемии.

**Стимуляция роста 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 энергию-генерирующей электронно-транспортной системы митохондрий. В пользу этого говорят форма спектров действия стимуляции, близкая к спектрам поглощения *NAD*, и зависимость величины фотоэффекта от содержания *NAD* и природы питательного субстрата среды: при выращивании дрожжей на сукцинате натрия, донирующего электроны в электронно-транспортную цепь в обход *NAD*-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 дрожжах *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, инициирующего 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.

Таким образом, в настоящей лекции рассмотрены различные типы фотобиофизических явлений, связанных с рецепцией и анализом световых потоков и, несомненно, наблюдающихся в живой природе. Это очень разнообразные явления, суть которых связана с наличием специфических хромофоров-рецепторов и «темновым» усилением сигнала. Однако молекулярные механизмы этих явлений остаются в большинстве случаев неизвестными. Больше всего в настоящее время известно о фитохромной системе рецепции у высших растений, которая будет рассмотрена позднее.

### 7.3. Повреждающее действие света на человека, животных и другие организмы

Ежедневно мы подвергаемся действию солнечного света и света от искусственных источников. Казалось бы, освещение нужно главным образом



для того, чтобы видеть. Однако помимо зрения под действием света в нашем организме осуществляются многие другие очень важные фотобиологические процессы, о протекании большинства которых мы не всегда даже догадываемся. Некоторые фотобиологические процессы хорошо знакомы каждому: все мы обгорали под действием солнечного света, после чего развивались стойкое покраснение кожи (эритема) и загар. Однако есть фотобиологические процессы, проявляющиеся не столь остро, как эритема. В этих случаях фотобиологическая природа процесса может быть выявлена только в специальных исследованиях.

Приведем некоторые примеры. Сейчас установлено, что важным фактором, ответственным за возникновение рака кожи, является ультрафиолетовый свет. Ведущая роль в возникновении катаракты (помутнения хрусталика глаза) также принадлежит фотохимическим реакциям. Люди, занимающиеся альпинизмом, сталкиваются с такой серьезной проблемой, как солнечные ожоги кожи и глаз, из-за увеличения интенсивности ультрафиолетового излучения. Больные псориазом знают, что заболевание обостряется зимой, тогда как летом псориазные бляшки либо совсем исчезают, либо уменьшаются в размерах. Причина заключается в лечебном действии ультрафиолетовых лучей, которых летом в спектре солнечного света значительно больше, чем зимой. Недостаток ультрафиолетового света может привести к D-авитаминозу. Важная регуляторная роль принадлежит также и видимому свету. Известно, что в пасмурные осенние дни у многих людей возникает синдром «осенней грусти», сопровождающийся психической депрессией и даже приводящий иногда к самоубийствам. Экспериментально доказано, что подобную депрессию можно снять, если человека помещать на несколько часов в течение ряда дней подряд в ярко освещенную комнату. Установлено, что красный свет ускоряет заживление ран. Перечень примеров фотобиологических процессов у человека может быть существенно увеличен.

В ходе эволюции выработались приспособления для полезного использования световой энергии. В то же время есть четко очерченная экологическая ниша, к существованию в которой мы приспособлены. Какие-либо изменения спектрального состава света или светового режима могут вызвать патологические реакции. Если будет разрушен стратосферный озон, то население Земли столкнется с резким усилением вредных эффектов ультрафиолетового облучения. Поэтому так важно не разрушать хрупкое равновесие в природе и не подвергать окружающую среду вредным антропогенным воздействиям в виде, например, выбросов в атмосферу огромного количества фторуглеродных соединений, разрушающих стратосферный озон.

**Избирательность действия света.** Особенностью биологического действия электромагнитного излучения оптического диапазона, включающего ультрафиолетовый (200–400 нм) и видимый (400–750 нм) свет, является ярко выраженная зависимость биологического эффекта от длины волны

излучения. Меняя длину волны, можно избирательно запускать те или иные фотобиологические процессы. Поэтому важно представлять, во-первых, действию света каких длин волн мы подвергаемся, а во-вторых, почему биологический эффект зависит от длины волны.

Коротковолновая граница солнечного света у поверхности Земли на уровне моря (на экваторе в безоблачный полдень) определяется длиной волны около 285 нм ([рис. 1.7](#)). Особенно важная роль в фильтрации солнечного излучения принадлежит слою атмосферного озона, расположенному на высоте примерно 20 км от поверхности Земли и определяющему коротковолновую границу спектра. В северных или южных широтах коротковолновая граница сдвинута в область больших длин волн, так как угол падения солнечных лучей на поверхность Земли там больше, чем на экваторе, и свету приходится проходить больший путь в атмосфере. Спектр испускания ламп накаливания, используемых в быту, по форме похож на солнечный, но отличается значительно меньшей интенсивностью в ультрафиолетовой области, в результате чего искусственный свет от ламп накаливания не способен вызывать такие характерные для солнечного света эффекты, как, например, эритема, рак кожи или терапевтический эффект при псориазе.

**Спектры поглощения и их связь со структурой молекул.** К фотобиологическим (фотомедицинским) относят процессы, начинающиеся с поглощения кванта света биологически важной молекулой и заканчивающиеся какой-либо физиологической реакцией (позитивной или негативной) на уровне организма. Ясно, что фотобиологический процесс инициируется только при условии поглощения кванта света подходящей молекулой-акцептором. Например, бактерицидные эффекты возникают в результате поглощения света молекулами ДНК в клетках бактерий и последующих химических реакций, запасших энергию квантов света (электронно-возбужденных) молекул ДНК. Следовательно, бактерицидные эффекты можно вызвать только тем светом, который поглощают молекулы ДНК.

Поглощение монохроматического света веществом описывается законом Бугера – Ламберта – Бера:

$$I = I_0 e^{-snl} \quad \text{или} \quad I = I_0 10^{-\xi cl},$$

где  $I$  и  $I_0$  – интенсивности ослабленного образцом и падающего на образец монохроматического света;  $l$  – толщина образца (см);  $n$  и  $c$  – концентрация вещества в образце, выражаемая соответственно в числе молекул на 1 см<sup>3</sup> (1/см<sup>3</sup>) или в молях на литр (М); коэффициенты  $s$  (см<sup>2</sup>) и  $\xi$  [л/(моль · см)] характеризуют способность молекул исследуемого вещества поглощать свет данной длины волны и называются поперечным сечением поглощения и молярным коэффициентом поглощения соответственно. Часто способность

образцов поглощать свет количественно оценивают величиной оптической плотности  $D = \xi cl = \lg(I_0/I)$ . Зависимость  $s$ ,  $\xi$  или  $D$  от длины волны называют спектром поглощения.

Спектр поглощения ДНК представляет собой широкую неструктурированную полосу и находится в области 200–315 нм с максимумом около 260 нм. Спектры поглощения других биологически важных молекул (белков, коферментов, пигментов и т. д.) также представляют собой широкие полосы, но по положению отличаются от спектров ДНК. Интересно, что почти все различно окрашенные биологически важные молекулы состоят, главным образом, из следующих бесцветных, не поглощающих свет элементов: С, Н, О и N. Способность поглощать свет и положение полосы поглощения определяется, прежде всего, тем, как связаны между собой в молекулах атомы углерода. На [рис. 7.10](#) представлены несколько примеров спектров поглощения.

Все молекулярные полосы поглощения широкие, их полуширина (ширина на половине высоты) варьирует в пределах 30–70 нм, форма полос напоминает гауссовские кривые распределения. При сопоставлении спектров с химической структурой молекул обращает на себя внимание то, что чем длиннее в молекуле система сопряженных двойных связей (система чередующихся двойных и одинарных связей между атомами углерода), тем в более длинноволновой области располагается спектр поглощения. Так, молекулы ненасыщенных липидов, содержащие несопряженные двойные связи (двойные связи разделены двумя или более одинарными связями), имеют максимум поглощения короче 200 нм. При окислении липидов двойные связи сдвигаются и становятся сопряженными. При сопряжении двух связей (диеновые конъюгаты) возникает максимум поглощения около 233 нм, при образовании триеновых конъюгатов появляется максимум около 260–280 нм. Ретиналь содержит шесть сопряженных связей и имеет максимум поглощения около 360 нм. У каротиноидов еще более длинная система сопряженных связей и еще более длинноволновое поглощение. Таким образом, достаточно посмотреть на структурную формулу молекулы, чтобы определить, способна ли она поглощать свет, и даже примерно предсказать положение полосы поглощения.

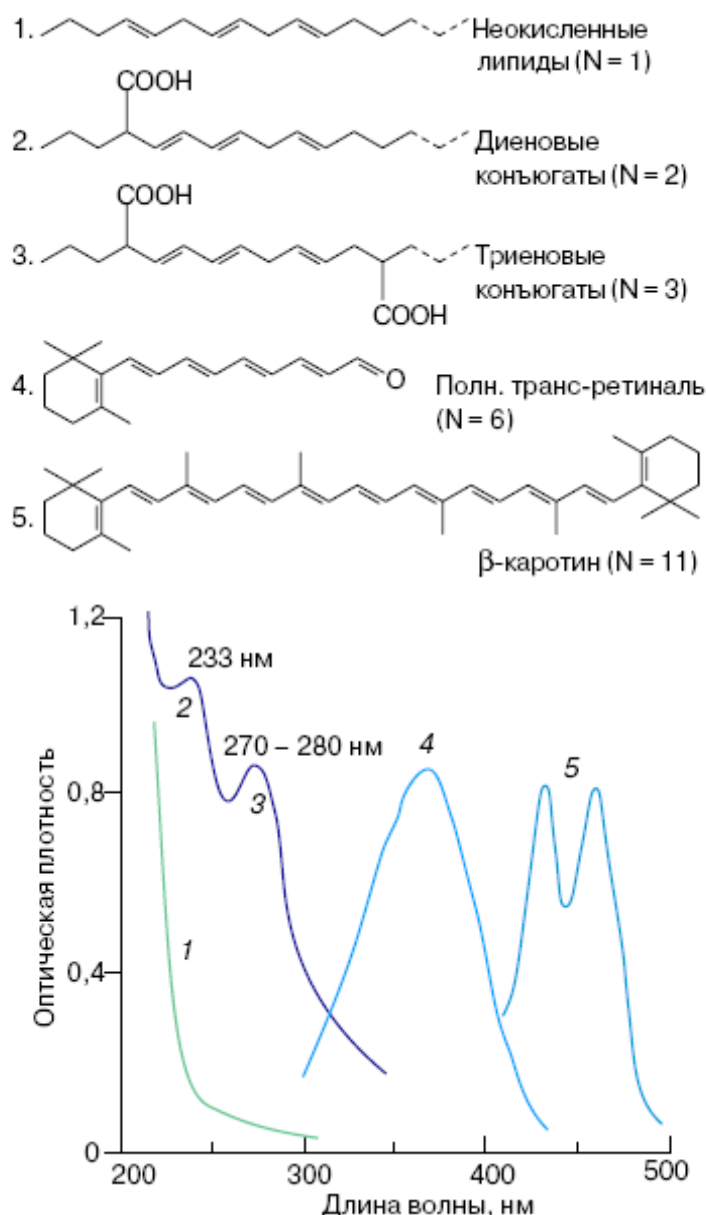


Рис. 7.10. Химическая структура молекул и спектры их поглощения:  
 $N$  – число сопряженных двойных связей в молекуле

Меняя длину волны, можно избирательно возбуждать и фотохимически модифицировать разные биомолекулы. На этом основана избирательность действия света – важнейшая черта фотобиологии, выгодно отличающая ее от радиобиологии. Поглощение квантов рентгеновского или гамма-излучения осуществляется не молекулами, а атомами и не зависит от того, в состав каких молекул эти атомы входят. Поэтому поглощение ионизирующего излучения происходит в основном теми элементами, которых в организме больше. А так как наш организм на 80% состоит из воды, то радиохимические процессы приводят преимущественно к появлению свободных радикалов воды, которые в дальнейшем повреждают белки, нуклеиновые кислоты и другие биомолекулы. Отсюда понятно, что ионизирующее излучение не может действовать избирательно.

**Количественная оценка биологического действия света.** Когда мы говорим об избирательном действии света, то подразумеваем, что интересующий нас фотобиологический эффект вызывается светом только определенного диапазона длин волн. Причем на краях этого диапазона эффективность действия света снижается, а если выйти за пределы «эффективного» диапазона, то данное явление, например, эритему, вызвать не удастся, сколь долго бы мы ни облучали исследуемый объект, в данном случае кожу. Ясно, что для оценки *биологической эффективности* действия света нужны количественные характеристики. Здесь не обойтись без понятий квантового выхода фотохимической реакции и спектра действия.

Молекула, поглотившая квант света и перешедшая в результате в электронно-возбужденное состояние, обязательно растрчивает энергию возбуждения. Путей растраты энергии может быть несколько: тепловые колебания, высвечивание квантов люминесценции, перенос энергии на другие молекулы, химические реакции и др. Каждый из указанных процессов осуществляется с определенной вероятностью, эту вероятность называют *квантовым выходом* данного процесса. Соответственно квантовый выход фотохимической реакции ( $j$ ) равняется отношению  $j = (\text{число поврежденных молекул} / \text{число поглощенных квантов})$ .

Вероятность осуществления каждого процесса растраты энергии возбуждения для молекул с сопряженными связями не зависит от энергии поглощенного кванта или, другими словами, от длины волны возбуждающего света. По закону Бугера – Ламберта – Бера молекулы представляют собой мишени с некоторым эффективным сечением  $s$ , при попадании в которое происходит поглощение кванта света. В фотохимии ввели понятие *поперечного сечения фотохимической реакции*  $s = js$  (см<sup>2</sup>). Видно, что  $s$  меньше  $s$  по абсолютному значению, так как  $j$  меньше единицы, но форма кривых зависимостей величин  $s$  и  $s$  от длины волны света одинакова. Зависимость от длины волны называется *спектром действия* фотохимической реакции. Для нахождения формы спектра действия проводят определение значений  $s$  при нескольких длинах волн. При исследовании относительно простых систем, например растворов ферментов, при каждой длине волны регистрируют дозовую кривую инактивации фермента. Скорость фотоинактивации описывается уравнением

$$dn/dt = -I_0(1 - e^{-snl})/l,$$

где  $n$  – концентрация активного фермента. Для разбавленных растворов это уравнение упрощается:

$$dn/dt = -I_0jsn,$$

и его решением будет выражение



$$\ln(n/n_0) = -I_0 t j s = -(\text{Доза облучения}) s,$$

где  $n_0$  – концентрация необлученного фермента. Строят график зависимости  $\ln(n_0/n)$  от дозы облучения и по тангенсу угла наклона полученной прямой находят величину  $s$ . Другим способом величину  $s$  можно найти, если определить дозу облучения, при которой активность фермента снижается в  $e$  раз (Доза<sub>37</sub>). Тогда

$$s = 1/\text{Доза}_{37}.$$

Определив, в конечном счете, зависимость  $s$  от длины волны, сравнивают форму полученного спектра действия фотоинактивации фермента со спектрами поглощения содержащихся в белке хромофоров. Форма спектра действия совпадает со спектром поглощения хромофора, ответственного за фотоинактивацию фермента.

Более сложная ситуация складывается при регистрации спектров действия таких сложных фотобиологических процессов, как, например, эритема кожи. При эритеме изменяется степень покраснения кожи, и именно этот параметр должен быть использован для количественной оценки действия света. При построении спектров действия эритемы по оси ординат откладывают величину *эритемной эффективности* света, которая по своему смыслу подобна поперечному сечению фотохимической реакции молекул, запускающих эритему. Эритемная эффективность обратна дозе облучения кожи, при которой достигается стандартный биологический эффект. За стандартный эффект обычно принимают минимальное, обнаруживаемое глазом покраснение кожи. Дозу облучения, вызывающую минимальное покраснение, называют *минимальной эритемной дозой* (МЭД). Как в фотохимии, так и в фотобиологии главной целью при исследовании спектров действия является выявление природы молекул-хромофоров, запускающих изучаемый процесс.

### 7.3.1. Биологическое действие ультрафиолетового света

#### Фотобиологическая классификация ультрафиолетового спектра.

Биологически активен весь диапазон оптического излучения (200–800 нм), но наиболее острые эффекты вызываются ультрафиолетовым светом (200–400 нм). На [рис. 7.11](#) приведены спектры пропускания поверхностных тканей человека. Видно, что ультрафиолетовые лучи практически полностью поглощаются эпидермисом, едва проникая в кожу. В фотомедицине принято разделять УФ-диапазон на три спектральные области: УФ-А (320–400 нм), УФ-В (280–320 нм) и УФ-С (длины волн короче 280 нм). Это разделение основывается в первую очередь на регистрации спектров действия эритемы ([рис. 7.10](#)).



**Эритема.** Как видно из [рис. 7.12](#), форма спектра действия УФ-эритемы сильно зависит от интервала времени между окончанием облучения и наблюдением покраснения. Обычно измерение спектров действия преследует несколько целей. Практическая ценность знания формы спектра действия очевидна, так как дает информацию о наиболее эффективных для индукции данного фотобиологического процесса длинах волн. Теоретически по форме спектра действия можно получить информацию о том, какая молекула-хромофор поглощает кванты света, запускающие данный фотобиологический процесс, так как форма спектра действия определяется формой спектра поглощения молекулы-хромофора. К сожалению, спектры действия эритемы не так просто использовать для определения природы молекул-хромофоров. Дело в том, что фотохимические реакции, ответственные за возникновение эритемы, протекают в глубине эпидермиса. На пути ультрафиолетового света к молекулам-хромофорам лежит поверхностный роговой слой, состоящий из уплотненных мертвых клеток. Роговой слой обладает значительным поглощением в ультрафиолетовом свете из-за высокого содержания в нем белков и нуклеиновых кислот и выполняет функцию светофильтра.

В результате оптического экранирования происходят искажения спектра действия эритемы, и он уже не совпадает со спектром поглощения молекул-хромофоров. К тому же сама по себе форма спектра действия изменчива и зависит от времени, прошедшего между облучением и регистрацией эритемы ([рис. 7.12](#)). Непонятно, какую из полученных кривых следует сравнивать со спектром поглощения молекулы-хромофора. Это обстоятельство еще более затрудняет интерпретацию спектров действия эритемы. Есть предположение, что эритема возникает в результате поглощения ультрафиолетового света молекулами белков.

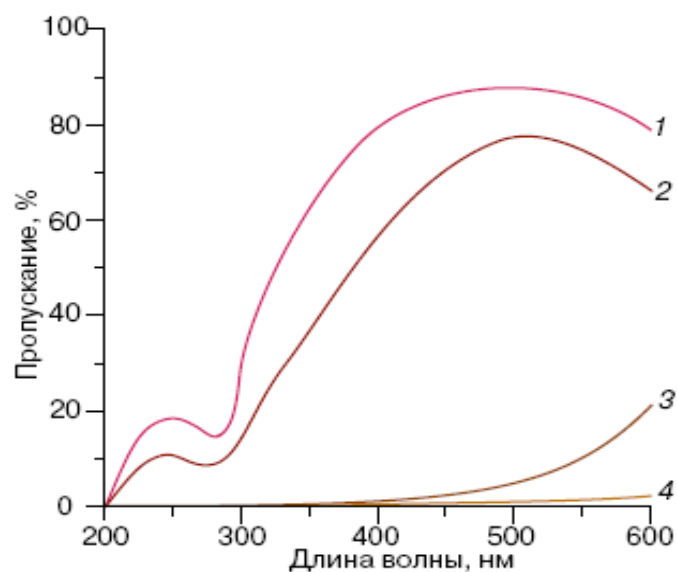


Рис. 7.11. Спектры пропускания поверхностных тканей человека с белой кожей:

1 – роговой слой 0,03 мм; 2 – слой эпидермиса 0,05 мм; 3 – слой кожи 2 мм;  
4 – слой кожи 25 мм

Другая гипотеза заключается в том, что под действием ультрафиолетового света в эпидермисе происходит фотохимическое разрушение витамина Е, который является природным антиоксидантом, защищающим клетки от процессов пероксидного окисления ненасыщенных липидов. Последняя гипотеза подтверждается следующими фактами: во-первых, показано, что ультрафиолетовый свет способен инициировать процессы пероксидного окисления липидов как *in vitro*, так и *in vivo*; во-вторых, нанесение на кожу, облученную ультрафиолетовым светом, экзогенного витамина Е или других антиоксидантов существенно снижает степень покраснения. Все сказанное о природе хромофоров относится только к УФ-В- и УФ-С-эритеме. В случае же УФ-А-эритемы процесс инициируется при участии каких-то других молекул-хромофоров, по-видимому, порфиринов, так как ни белки, ни витамин Е в УФ-А-области спектра не поглощают.

УФ-А-излучение вызывает эритему со значительно меньшей эффективностью, чем УФ-В или УФ-С. Эритемная эффективность при 365 нм в 100–1000 раз ниже, чем при 297 нм. УФ-А-эритема проявляется сразу после облучения. При пороговой дозе (около 130 кДж/м<sup>2</sup>) немедленно возникающее покраснение проходит за несколько минут. При дозе УФ-А 500 кДж/м<sup>2</sup> покраснение сохраняется в течение суток после облучения. УФ-А-эритема имеет фиолетовый оттенок, что указывает на расширение глубоко расположенных сосудов дермы. УФ-А-излучение вызывает гистологически обнаруживаемую воспалительную реакцию в дерме, но не в эпидермисе.

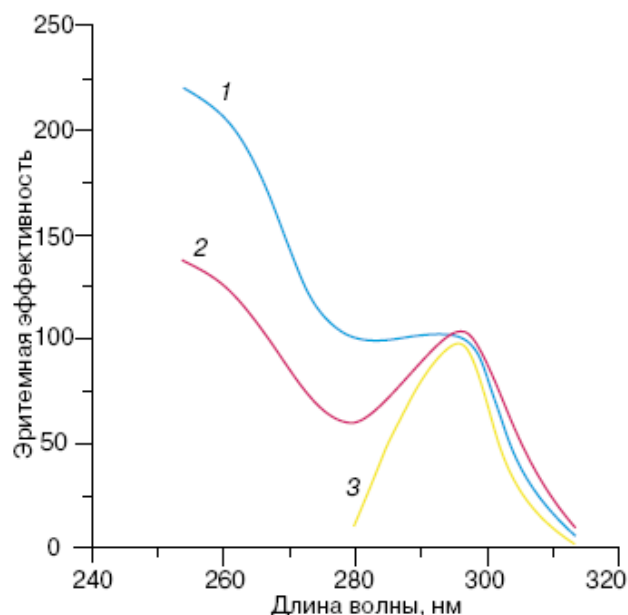


Рис. 7.12. Спектры действия эритемы, зарегистрированные через разное время после УФ-облучения кожи: 1 – 8 часов после облучения; 2 – 24 часа; 3 – 10 суток

УФ-В-эритема возникает не сразу после облучения, поэтому ее относят к замедленным процессам. Появлению эритемы предшествует латентный период, длительность которого обратно пропорциональна дозе облучения, но

никогда не превышает 8–10 часов. МЭД значительно варьирует в различных участках тела. Например, для кожи живота белого незагорелого человека МЭД составляет  $210 \text{ Дж/м}^2$ , а для кожи ноги –  $780 \text{ Дж/м}^2$ . Степень покраснения кожи пропорциональна логарифму дозы. Если доза УФ-В-излучения превышает 10 МЭД, то вслед за ярко-красной эритемой на коже появляются заполненные жидкостью пузыри, свидетельствующие о сильном ожоге – эдеме.

УФ-С-эритема, аналогично УФ-В-эритеме, является замедленным процессом. Однако УФ-С-эритема никогда не бывает ярко-красной и ни при каких дозах облучения не переходит в эдему. Коварство действия ультрафиолетового излучения заключается в том, что в момент получения опасной дозы человек ничего не чувствует. Дело в том, что специализированные рецепторы ультрафиолетового излучения в коже отсутствуют, а тепловой эффект МЭД и даже эдемной дозы УФ-В-излучения так мал, что человек его практически не ощущает. Так, при получении дозы в  $2000 \text{ Дж/м}^2$ , даже если вся энергия УФ-В-излучения перейдет в тепло, нагрев поверхностного слоя кожи толщиной 1 мм, в котором произошло поглощение, не превысит  $0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Существенно больший тепловой эффект вызывает УФ-А-излучение, которое почти не эритемогенно, а также видимый свет и особенно инфракрасное излучение, они совсем не обладают эритемогенным действием. Интересно отметить, что в спектре солнечного света УФ-С-излучение отсутствует полностью, на долю УФ-В приходится не более 1,5 % энергии солнечного излучения, УФ-А – не более 6–8 %. Тем не менее наибольшее внимание привлекает именно УФ-В-диапазон.

#### **Загар как защита от повреждающего действия ультрафиолетового света.**

Ультрафиолетовое излучение помимо эритемы вызывает гиперпигментацию кожи – загар. Загар является замедленным процессом и начинает развиваться в коже через 2–3 суток после облучения, достигает максимума на 13–21-й день и затем угасает за несколько месяцев. Спектр действия загара похож на спектр действия эритемы, т. е. наиболее эффективно опять же УФ-В-излучение. Ультрафиолетовое излучение запускает сложную цепь реакций биосинтеза меланина в специализированных клетках – меланоцитах.

Появление меланина в коже является важной защитной реакцией организма. В настоящее время установлено как минимум три механизма защитного действия меланина. Во-первых, меланин служит оптическим экраном, поглощающим ультрафиолетовый свет, таким образом он физически защищает клетки кожи от пагубного действия ультрафиолетового излучения. Другие два механизма – химические. Дело в том, что под действием ультрафиолетового облучения в коже образуются свободные радикалы, запускающие, в частности, цепные реакции пероксидного окисления липидов. Так вот, с одной стороны, меланин является эффективным перехватчиком свободных радикалов и за счет этого он обрывает цепные реакции окисления. С другой стороны, меланин способен связывать (хелатировать) ионы двухвалентного железа. Роль ионов

двухвалентного железа заключается в том, что они разрушают пероксиды с образованием свободных радикалов. Это приводит к разветвлению реакций цепного окисления. Хелатированное меланином железо уже не может участвовать в реакциях разветвления.

Сказанное имеет практический смысл. Попад на пляж весной, нельзя забывать, что кожа за зиму утратила меланиновую защиту. Поэтому первые несколько дней не следует злоупотреблять солнечными ваннами. Минимальная доза ультрафиолетового облучения, запускающая меланогенез, примерно вдвое ниже МЭД. Поэтому в первые дни следует загорать недолго, так, чтобы эритема еще не возникла, а образование пигмента уже инициировалось. И только через несколько дней, накопив в коже меланин, можно постепенно увеличивать время пребывания под солнцем. Но все же злоупотреблять пребыванием на солнечном свете не следует и после появления загара. Ультрафиолетовый свет, и в первую очередь УФ-В, вызывает не только красивую пигментацию кожи, но и нежелательные эффекты. У людей, хронически подвергающихся действию солнечного света, происходит преждевременное старение кожи, на открытых участках тела появляются морщины, особенно на шее, руках, груди. Последствием хронического облучения может стать рак кожи. Наиболее канцероопасным является опять же УФ-В-излучение.

**Иммуносупрессия.** Другим эффектом ультрафиолетового облучения является иммуносупрессия, проявляющаяся в подавлении клеточно-опосредованного иммунитета как у человека, так и у животных. У животных это явление наблюдают по супрессии реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Реакция ГЗТ заключается в следующем. В кровь мыши вводят какой-либо антиген, например эритроциты барана. В течение нескольких последующих суток происходят иммунологическое опознание этого антигена и наработка *T*-лимфоцитов, способных избирательно опознавать и уничтожать данный антиген. При повторном введении антигена в организм к месту введения устремляются *T*-лимфоциты, стремящиеся его уничтожить. В результате в месте введения антигена развивается воспалительная реакция, регистрируемая по величине отека. Диффузия *T*-лимфоцитов осуществляется медленно, поэтому отек развивается примерно за сутки и вся реакция называется замедленной. Если подвергнуть кожу мышей УФ-В-облучению, то происходит зависящая от дозы супрессия реакции ГЗТ. УФ-В-индуцированная супрессия реакции ГЗТ специфична по отношению к иммунизирующему антигену и может быть перенесена от животного к животному путем переноса *T*-лимфоцитов от иммунизированных антигеном и УФ-В-облученных животных к животным, подвергавшимся только иммунизации без облучения.

Иммуносупрессия инициируется ультрафиолетовым светом в эпидермисе, а проявляется на уровне всего организма и может приводить как к отрицательным, так и положительным последствиям. С одной стороны,

подавление иммунной системы способствует возникновению и развитию злокачественных новообразований. С другой стороны, есть заболевания (например псориаз, различные артриты и др.) с выраженной аутоиммунной компонентой, когда возникает воспалительная реакция на собственные антигены организма. В этих случаях ультрафиолетовый свет используется как эффективное терапевтическое средство, подавляющее аутоиммунные реакции.

Существует точка зрения, что биологическая целесообразность иммуносупрессии, индуцированной УФ-В-излучением, заключается в том, что эта реакция является природным регуляторным механизмом, контролирующим аутоиммунную атаку на антигены, возникающие в коже при ее повреждении ультрафиолетовым излучением. Измерение спектра действия иммуносупрессии показало совпадение его формы с формой спектра поглощения *транс*-уроканиновой кислоты, содержащейся в роговом слое эпидермиса. Под действием ультрафиолетового света происходит фотоизомеризация уроканиновой кислоты из *транс*- в *цис*-форму. Иммуносупрессирующие эффекты экзогенной *цис*-уроканиновой кислоты известны. Таким образом, можно предполагать, что уроканиновая кислота является фоторецептором в процессах УФ-индуцированной иммуносупрессии.

Существуют, безусловно, положительные фотобиологические процессы, инициируемые ультрафиолетовым светом. К ним можно отнести синтез витаминов группы D. Конечные стадии биосинтеза этих витаминов имеют фотохимическую природу. Таким образом, ультрафиолетовое излучение вызывает у человека многочисленные фотобиологические эффекты. В разумных дозах это излучение необходимо человеку и является нормальным экологическим фактором. Однако при больших дозах ультрафиолетового облучения, особенно УФ-В, резко возрастают неблагоприятные эффекты. Здесь самое время вспомнить об озоновой дыре в атмосфере. Стратосферный озон определяет коротковолновую границу солнечного ультрафиолетового излучения. Разрушение озона происходит, в частности, при участии выбрасываемых в атмосферу антропогенных фторуглеродистых соединений, широко используемых в промышленных и бытовых холодильниках, а также при изготовлении аэрозолей.

### 7.3.2. Летальное действие ультрафиолетового света на микроорганизмы

**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;  $\sigma$  – поперечное сечение инактивации;  $D$  – доза;  $\sigma D$  – среднее число ударов по чувствительной единице (при  $\sigma D = 1$  на клетку в среднем приходится по одному летальному удару). Отсюда  $\sigma$  равно обратной величине дозы, при которой выживаемость составляет 37 % ( $e^{-1} = 0,37$ ):

$$\sigma = 1 / D_{37} \text{ (в квантах на } 1 \text{ мм}^2\text{)}.$$

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

$$N / N_0 = e^{-\sigma D(1 + \sigma D)},$$

а многоударная ( $k$  ударов) — уравнением

$$N / N_0 = 1 - e^{-\sigma D} \sum_{k=1}^{n-1} (\sigma D)^k / k!,$$

где  $n$  – число попаданий.

Еще в 1929 году 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.



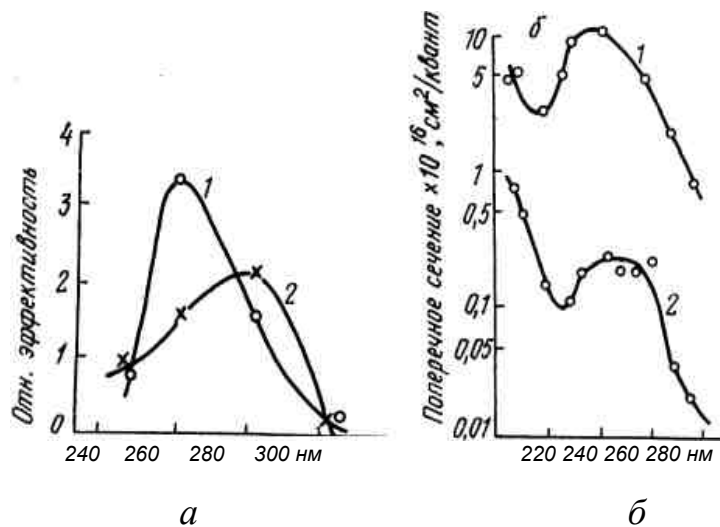


Рис. 7.13. Спектры действия вируса гриппа \* :

*a* – подавления инфекционной активности (1) и гематглютинации (2);

*б* – деструкции (1) и способности к интерференции (2)

Как правило, спектры действия летального эффекта имеют выраженный нуклеиновый максимум при 260–265 нм (рис. 7.13). Однако для отдельных организмов описаны как чисто «белковые» с максимумом при 280 нм, так и смешанные спектры летального эффекта с максимумами при 260 и 280 нм, указывающие на то, что в акцепции 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.

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.

**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 не способен проникнуть в клетку).

Как правило, потеря вирулентности осуществляется по *одноударному*

\* McLaren A., Shugar D., 1964

механизму и имеет «нуклеиновый» спектр действия (рис. 7.14). Дополнительное облучение уже инактивированного фага повреждает по многоударному механизму его чехол (белковый спектр действия), что связано с фотоденатурацией многих молекул белка. Однако у некоторых фагов фоточувствительность нуклеинового и белкового компонентов соизмерима. Так, белковый спектр действия с максимумом при 280 нм 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 нуклеиновым максимумом при 260 нм представлен и белковый максимум при 280 нм.

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.

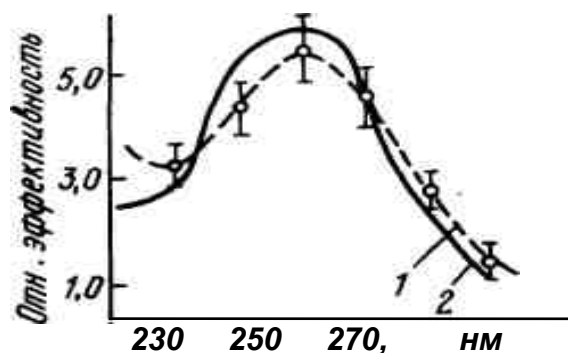


Рис. 7.14. Спектр действия инактивации вируса X картофеля (1) и спектр поглощения вирусной РНК\* (2)

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 фХ174 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

\* Kleczkowski A., Govier D., 1969

представляют опыты МакЛарена, показавшего, что два различных штамма вируса табачной мозаики ( $U_1$  и  $U_2$ ) обладают различными квантовыми выходами инактивации в водной суспензии, но характеризуются одинаковой фоточувствительностью изолированных РНК, и квантовый выход инактивации реконструированных вирусов, состоящих из РНК  $U_1$  + белок  $U_2$  и РНК  $U_2$  + белок  $U_1$ , 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 *фото-димеризацией*, а не фотогидратацией оснований, поскольку после пострадиационной 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 сотрудниками. Ими была обнаружена прямая пропорциональная зависимость между абсолютным числом тиминовых остатков и поперечным сечением инактивации у природной и репликативной однотяжевой ДНК фага  $\phi X174$ . Хроматографический анализ гидролизованной ДНК фагов  $T4$  и  $\phi X174$ , 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  $T$ -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 Зауэрбира и Хауга, только один из семи димеров приводит к инактивации фага  $T4$ . 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 ( $T-T$ )

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 нефотореактивируемых 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 ( $M \sim 5-10^6$ ) 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.

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.

**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 чувствительность 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/м<sup>2</sup>.

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* ( $LD_{90}$  = 11200 Дж/м<sup>2</sup>). Еще большие дозы необходимы для подавления прорастания (летальный эффект) пыльцы высших растений:  $LD_{37}$  = 10<sup>5</sup>–10<sup>6</sup> Дж/м<sup>2</sup>.

Резистентность клеток животных и человека в культуре относительно низка:  $LD_{90}$  = 10–50 Дж/м<sup>2</sup>. 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 сенситизаторами. Так, резистентность микроорганизмов повышается при культивировании их на глюкозопептонных 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 °С.

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 выполняется в пределах тысячекратных изменений интенсивности облучения.

Хотя квантовый выход бактерицидного действия ультрафиолетового света невелик (10<sup>-5</sup>–10<sup>-8</sup>), одноударность процесса означает, что всего *единственный* «удачно» поглощенный квант приводит к гибели клетки. Уже из этого следует, что УФ-свет прежде всего повреждает 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 (*mРНК*, белков) у дочерних клеток проявится критический дефект генома. Действительно, в эксперименте зарегистрирована 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. 7.15). 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 *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 пострадиационным коротковолновым облучением (230 нм);

6) резкое увеличение бактерицидной активности ультрафиолетового света после галогенизации пиримидиновых оснований ДНК, увеличивающей ее фоточувствительность.



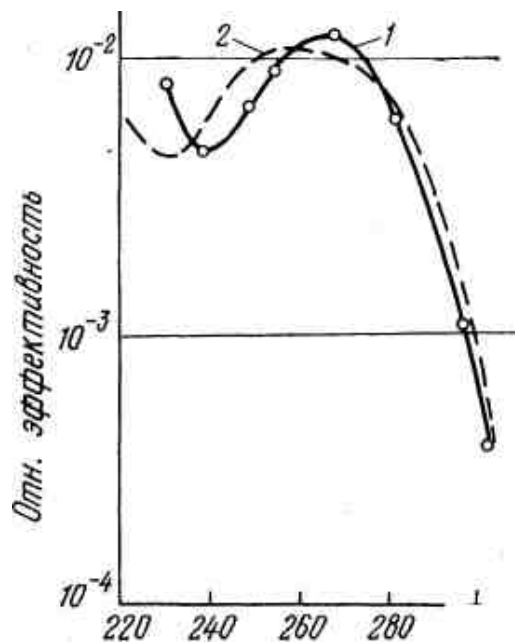


Рис. 7.15. Спектр действия гибели *E. coli* (1) и спектр поглощения ДНК (2)

Однако роль каждого из димеров, возникающих при ультрафиолетовом облучении, неодинакова. Например, по данным Сетлоу, клетка *E. coli* 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  $70^\circ$ , 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.

Как мы могли убедиться, весь оптический диапазон электромагнитного излучения Солнца и искусственных источников активно воздействует на организм человека и животных. Наиболее острые эффекты вызываются ультрафиолетовым светом. Видимое излучение хотя и не вызывает воспалительных реакций, но является эффективным регулятором биологических ритмов, а в некоторых случаях также терапевтическим фактором. Чтобы не вступать в конфликт с природой, избегать вредных воздействий света, а также использовать оптическое излучение в целях профилактики и лечения некоторых заболеваний, необходимо знать закономерности фотобиологических процессов.

В отношении гибели клеток 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 репарирующих систем, способных освобождать ДНК клетки от значительной части (до 98%) элементарных фотохимических повреждений.

В целом, несмотря на огромное разнообразие фотохимических процессов, приводящих к повреждению организмов и клеток, и очевидные различия этих процессов, можно выявить некоторые общие стадии. Каждый фотобиологический процесс начинается с поглощения квантов света молекулой-хромофором. Для выяснения природы этих молекул измеряют

спектры действия. На втором этапе часть электронно-возбужденных молекул в соответствии со значениями квантовых выходов фотохимических реакций модифицируется с образованием фотопродуктов. Первичные стадии фотобиологических процессов являются предметом изучения физиков и биофизиков. Далее фотопродукты вступают в темновые биохимические реакции. Эти биохимические реакции могут приводить к локальным (на уровне отдельных органов и тканей) или системным (на уровне всего организма) физиологическим эффектам. В расшифровке биохимических и физиологических эффектов света участвуют специалисты многих специальностей: эндокринологи, иммунологи, онкологи, дерматологи и т. д. Таким образом, в области фотобиологии сталкиваются интересы разных наук. Часто говорят, что наиболее интересные открытия встречаются на стыке наук. В этом отношении фотобиология и фотомедицина являются плодородным полем для исследователей.

## 7.4. Механизмы рецепции света у высших растений

Растения обладают сложной системой фотосинтеза, требующей для своего строительства значительных энергетических и материальных затрат. По этим причинам высокоэффективная работа системы фотосинтеза нуждается в совершенной регуляции. Выяснению организации и механизмов функционирования этой регуляторной системы посвящены многочисленные исследования. В результате этих исследований прояснены многие ранее неясные аспекты. Основные положения о рецепции и механизмах анализа «качества» света излагаются в настоящем параграфе.

### 7.4.1. Рецепция световых сигналов растениями

**Принципы фоторецепции.** Чтобы растение «почувствовало» квант света, необходимы пигмент-белковые комплексы (фоторецепторы), поглощающие в данной части спектра и преобразующие квант в биохимический сигнал, т. е. должна произойти *фотохимическая реакция*. Энергия поглощенного кванта преобразуется двумя путями (в зависимости от фоторецептора): 1) изменяется конформация белка и запускается каскад фосфорилирования (рецептор красного света); 2) идут реакции восстановления вторичных мессенджеров (рецептор синего света). Далее активизируется система вторичных мессенджеров, передающих световой сигнал.

Как в световой фазе фотосинтеза, так и при сигнальной фоторецепции энергия квантов света преобразуется в энергию химических связей. Но при этом в фотосистемах хлоропластов конформация белковых комплексов изменяется мало, низкая чувствительность к свету и высокий КПД энергопреобразования. В отличие от фотосистем фоторецепторы сильно

изменяют конформацию белковых комплексов, очень чувствительны к свету, имеют низкий КПД энергопреобразования, локализованы в ядре и в цитоплазме.

**Физиологически важные области спектра.** Поскольку жизнь растений зависит от фотосинтеза, они должны оценивать количество и качество света. Согласно физическим принципам есть предел энергии кванта для преобразования в световых реакциях фотосинтеза: фотосистема I поглощает и преобразует кванты из красной области спектра при  $\lambda < 700$  нм, а фотосистема II – при  $\lambda < 680$  нм. Если зеленые растения освещать более длинноволновыми квантами ( $\lambda > 700$  нм), растение погибнет: энергии этих квантов недостаточно для световой стадии фотосинтеза. Таким образом, красные лучи можно разбить на две резко отличающиеся области – собственно *красную*, пригодную для фотосинтеза ( $\lambda < 700$  нм). Эту и более коротковолновую область до 400 нм называют фотосинтетически активной радиацией (ФАР). *Дальняя красная* область ( $\lambda > 700$  нм) для фотосинтеза не пригодна.

Дальний красный свет и темнота должны приводить к похожим ответам – это сигнал, что условий для фотосинтеза нет.

**Фитохром и криптохром.** Для оценки качества и количества квантов в красной области у растений есть фоторецептор *фитохром*, состоящий из *фитохромобилина* (пигмент, аналогичный фикобилинам) в комплексе с белком.

Фитохром может находиться в двух основных формах: красной  $\Phi_{кр}(660)$  и дальней красной  $\Phi_{дкр}(730)$  ([рис. 7.16](#)). Красные кванты ( $\lambda = 660$ ) поглощаются красной формой фитохрома, и происходит переход  $\Phi_{кр} \rightarrow \Phi_{дкр}$ . Появление  $\Phi_{дкр}$  под действием света с  $\lambda = 660$  нм – сигнал о том, что свет пригоден для фотосинтеза. Свет с длиной волны 660 нм (пригодный для фотосинтеза) приводит к превращению красной формы фитохрома в дальнюю красную; это аналогично переключению выключателя в положение *ON* (слева на [рис. 7.16](#)). Дальняя красная форма фитохрома  $\Phi_{дкр}$  переходит в  $\Phi_{кр}$  (1) при действии света с  $\lambda = 730$  нм, и (2) самопроизвольно в темноте (этот переход медленнее). Появление  $\Phi_{кр}$  под действием света с  $\lambda = 730$  нм или в темноте – сигнал о том, что условий для фотосинтеза нет. Свет с длиной волны 730 нм (не пригодный для фотосинтеза) приводит к переходу дальней красной формы фитохрома в красную; это аналогично переключению выключателя в положение *OFF* (справа на [рис. 7.15](#)). Фитохромная система похожа на переключатель: если есть кванты с  $\lambda = 660$  нм, то система ожидает сигнала от  $\lambda = 730$  нм и наоборот. В полной темноте чувствительность растений к свету возрастает: содержание фитохрома увеличивается. Как только растения

переносят на свет, концентрация фитохрома уменьшается. Промежуточные короткоживущие формы фитохрома для «красного» перехода (*Prelumi-R*, *lumi-R693*, *meta-Ra663*, *meta-Rc725*) отличаются от промежуточных форм для «дальнего красного» перехода (*Prelumi-F*, *lumi-F6-5*, *meta-F665*).

Темновой самопроизвольный переход аналогичен выключению красного света – *OFF* на [рис. 7.16](#).

На основании сигналов фитохромной системы растение изменяет стратегию роста: готовится к фотосинтезу или все силы расходует на рост; приступает к цветению или к листопаду; семена прорастают или дожидаются более благоприятного освещения и т. д.

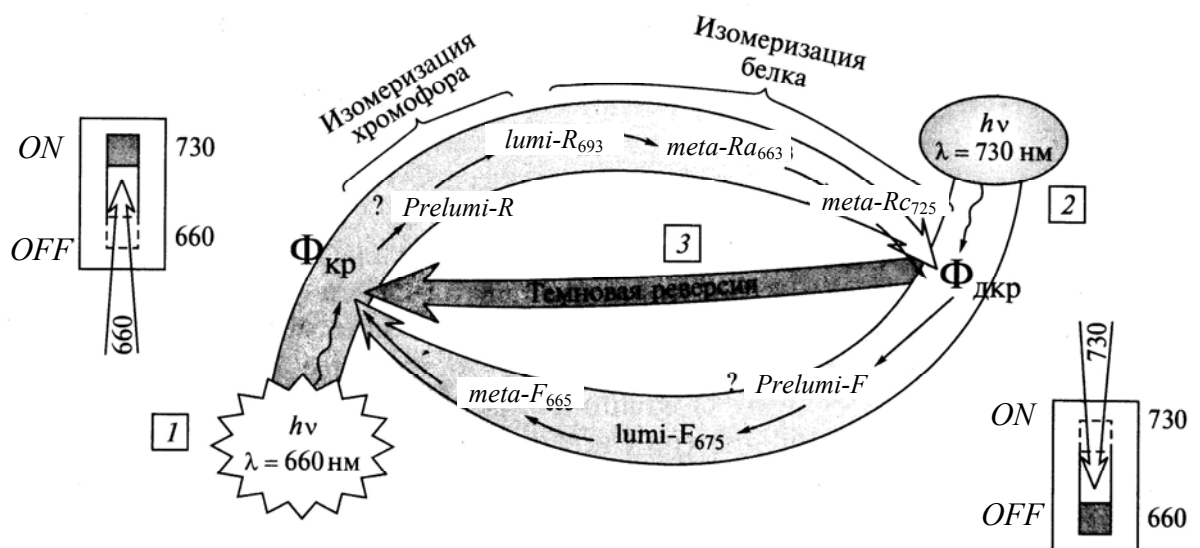


Рис. 7.16. Фотоконверсия форм фитохрома

Максимумы поглощения каротиноидов, флавинов, хлорофиллов и других пигментов находятся в синей области спектра, она также физиологически важна. У растений синий свет воспринимают *криптохромы*, *фототропин*. Фоторецепторы синего света работают иначе: происходят окислительно-восстановительные реакции. Поступающие сигналы «помогают принять локальные решения»: определить направление максимальной освещенности при фототропизме, открыть устьица и т. д. Рецепторы красного и синего света функционируют, взаимодействуя друг с другом. У растений есть системы, «чувствующие» ультрафиолет и активирующие защитные механизмы, но фоторецепция в УФ-части спектра изучена недостаточно.



### 7.4.2. Фоторецепция в красной области спектра: фитохромная система

**История открытия фитохрома.** В 1952 году американец Г. А. Бортвик изучал прорастание семян салата. В полной темноте набухшие семена не прорастали, но прорастали после нескольких секунд освещения. Семена были настолько чувствительными к свету, что приходилось работать с ними как с фотоматериалами, обертывая образцы светонепроницаемой бумагой или фольгой. Был получен спектр физиологической реакции: график зависимости процента проросших семян от длины волны. Оказалось, что дальний красный свет ( $\lambda = 730$  нм) тормозит реакцию прорастания. При последовательном освещении красным (660 нм) – дальним красным (730 нм) – красным (660 нм) семена прорастают, но если последнюю вспышку света заменить на дальнюю красную (730 нм), то прорастание замедлялось. Наблюдается К/ДК-обратимость, т. е. физиологический ответ при низкой интенсивности освещения можно обратить. В итоге растения дают тот ответ, который вызывает последняя вспышка света.

Была выдвинута гипотеза, что в семенах есть пигмент-рецептор, который обладает свойством «переключаться» при действии внешнего стимула: красного или дальнего красного света. Этот фоторецептор был назван *фитохромом* (*phyton* – растение; *chromos* – краска, пигмент).

Спектр физиологической реакции прорастания семян позволил начать поиски и выделение пигментов, обладающих таким же спектром поглощения. Из растений выделяли очередной пигмент, его спектр сравнивали с физиологическим спектром. Эта стратегия поиска увенчалась успехом: всего через 7 лет У. Л. Батлер и С. Б. Хендрикс выделили фитохром в чистом виде и охарактеризовали его ([рис. 7.17](#)). Для сравнения показаны положения максимумов поглощения  $P_{680}$  и  $P_{700}$ . ФАР – область фотосинтетически активной радиации.



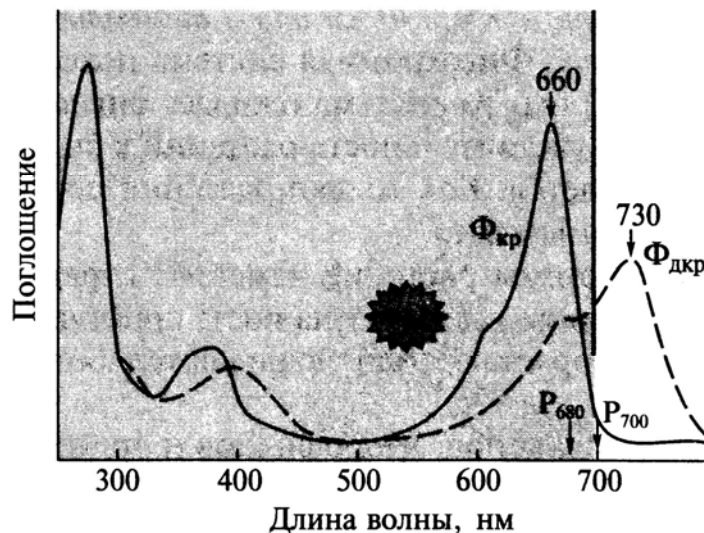


Рис. 7.17. Спектр поглощения фитохрома  $\Phi_{660}$  и  $\Phi_{730}$   
(для сравнения показаны положения максимумов поглощения  $P_{680}$  и  $P_{700}$ ;  
ФАР – область фотосинтетически активной радиации)

Физиологические ответы фитохромной системы были разделены на три группы: 1) ответ на сверхнизкую интенсивность света ( $0,1\text{--}1$  мкмоль квантов/ $\text{м}^2$ ); 2) ответ на низкую интенсивность ( $1\text{--}1000$  мкмоль квантов/ $\text{м}^2$ ); 3) высокоэнергетический ответ (более  $1000$  мкмоль квантов/ $\text{м}^2$ ).

**Фотоконверсия фитохрома. Фитохромы А и В.** Фитохром представляет собой димер белка с ковалентно связанной хромофорной группировкой из четырех пиррольных колец (*A*, *B*, *C* и *D*). Молекула хромофора синтезируется сначала как замкнутый тетрапиррол (гем), а затем размыкается и встраивается в белок. Хромофор имеет структуру, близкую к фикобилинам.

Как и ожидалось, хромофор фитохрома (фитохромобилин) существует в двух основных спектральных формах, которые переходят друг в друга. Форма  $\Phi_{660}$  (красная) улавливает «красные кванты» света и переходит в  $\Phi_{730}$  (дальнюю красную). Это объясняет эффект К/ДК-обратимости: при освещении красным светом форма  $\Phi_{660}$  исчезает (форма  $\Phi_{730}$  накапливается). Если после этого осветить растение светом с длиной волны  $730$  нм, форма  $\Phi_{730}$  перейдет в  $\Phi_{660}$ . Последовательные вспышки приводят к тому, что сначала весь фитохром переходит в одну форму, а потом в другую и т. д. Для физиологической реакции важна именно последняя форма фитохрома, т. е. последняя короткая вспышка, которой освещали растение.

Главным событием, приводящим к фотоконверсии форм фитохрома, является поворот кольца *D* относительно кольца *C* (*цис-транс-изомеризация* в метановом мостике) ([рис. 7.18](#)). Эта реакция приводит к изменению конформации белкового окружения хромофора и димера в целом. Первичная форма возбужденной хромофорной группировки оказывается недостаточно стабильной и самопроизвольно через ряд этапов переходит в более стабильные формы причем промежуточные формы для перехода из  $\Phi_{660}$  в  $\Phi_{730}$  отличаются от промежуточных форм для обратного перехода.

У арабидопсиса известны 5 генов, отвечающих за биосинтез белкового компонента фитохрома. По количеству белка преобладают фитохром *A* и фитохром *B*, различающиеся не только белковой частью, но и спектром поглощения (эффект различного окружения хромофора). Фитохромы *C*, *D* и *E* – минорные. В белковой части всех фитохромов ближе к *N*-концу есть консервативный домен, ковалентно связывающий фитохромобилин. При его повреждении хромофор не встраивается в фитохром. *C*-концевые участки отвечают за передачу сигнала (обычно есть два гистидинкиназных домена).

По сравнению с  $\Phi(B)$  в спектре поглощения фитохрома *A* более широкие пики, у  $\Phi(A)_{660}$  максимум поглощения – 660, однако остается заметное поглощение и в дальней красной области. Это означает, что  $\Phi(A)_{660}$  переходит в  $\Phi(A)_{730}$  не только при облучении квантами с  $\lambda = 660$  нм, но и при освещении дальним красным светом высокой интенсивности. Следовательно, у реакций, вызываемых  $\Phi(A)$ , нет К/ДК-обратимости. Фитохром *A* отвечает как за ответы на сверхнизкие интенсивности красного света ( $\lambda = 660$  нм), так и за высоко энергетический ответ на дальний красный ( $\lambda = 730$  нм). В спектре поглощения фитохрома *B* пики более узкие, у формы  $\Phi(B)_{660}$  плечо не заходит в дальнюю красную область. Фитохром *B* отвечает за ответы на низкую интенсивность и обеспечивает К/ДК-обратимость. Наличие фитохромов *A* и *B*, отличающихся спектрами поглощения, «позволяет» растению различать: 1) полную темноту; 2) свет, обогащенный ДК-квантами; 3) освещение, пригодное для фотосинтеза.

Растения, выращенные в темноте, стараются повысить чувствительность к свету, повышая содержание фитохрома *A* (именно  $\Phi(A)$  отвечает за восприятие света любого качества). При освещении (независимо от того К или ДК) концентрация  $\Phi(A)$  снижается примерно в 100 раз.

Киназная активность фитохромов зависит от состояния хромофора. Форма  $\Phi_{730}$  является активной (она получила красный свет с  $\lambda = 660$ ), а  $\Phi_{660}$  (образуется в темноте или на ДК) не активна как киназа. Фосфорилирование фитохромов также меняет их активность. Возможно, фитохромы могут автофосфорилироваться. В число возможных вторичных мессенджеров фитохромного сигнала входят гетеротримерные *G*-белки, циклическая ГМФ и кальций.

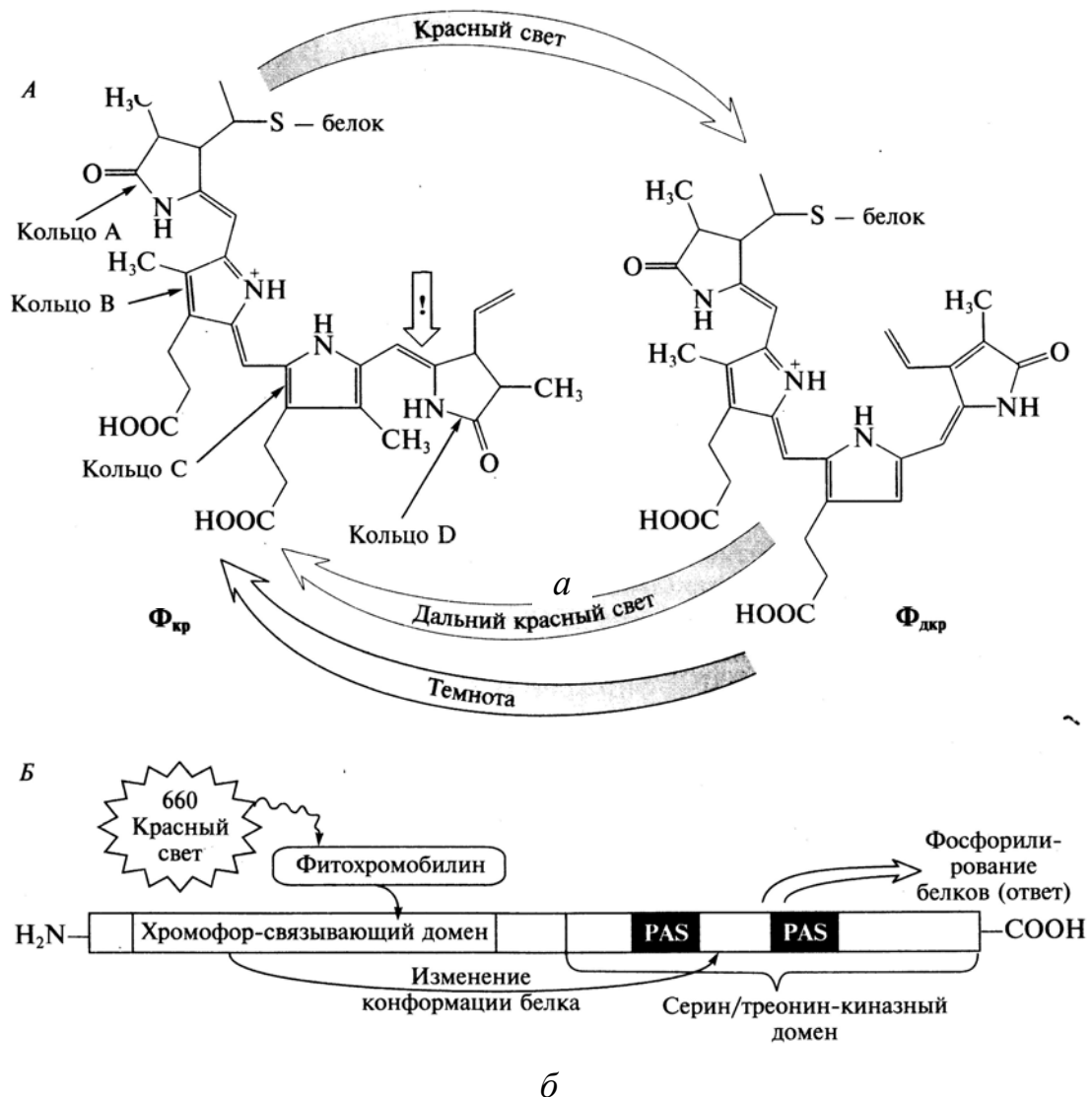


Рис. 7.18. Структура фитохрома: *а* – структура хромофорной группировки и ее изменение при фотоконверсии форм фитохрома; *б* – функциональные домены белковой части фитохрома

У растений, выращенных в темноте, фитохромы обычно находятся в цитозоле. Для перемещения фитохромов *A* и *B* в ядро нужны разные световые стимулы. Так, в конформации  $\Phi_{660}$  фитохром *B* не может пересекать ядерную мембрану, а после фотоконверсии красным светом аккумулируется в ядре.  $\Phi(A)$  переходит в ядро при освещении как ДК высокой интенсивности, так и красным светом. Интересно, что на *C*-концевом участке у фитохромов есть два *PAS*-домена, которые встречаются в транскрипционных факторах. *PAS*-домены важны для ДНК-белковых и для белок-белковых взаимодействий. Повреждение *PAS*-доменов нарушает функционирование фитохрома. Это означает, что, проникая в ядро, фитохром участвует в геномной регуляции, связываясь в комплексы с факторами транскрипции.

**Этиоляция и деэтиоляция.** У цветковых растений в отсутствие условий для фотосинтеза хлорофилл не образуется, не происходит сборка

светособирающих комплексов, пластиды имеют агранальную структуру (этиопласты). Растения, выросшие в темноте, становятся белыми или желтоватыми, междоузлия удлинены, а листовые пластинки часто превращаются в чешуи. Процесс «обесцвечивания» растений при недостатке света называют *этиоляцией*. Этиоляция – адекватная реакция на недостаток света: фотосинтетическая функция сведена к минимуму, рост происходит за счет растяжения (форма роста, требующая минимум пластических веществ) (рис. 7.19). Растение «экономит» органические вещества, «отказавшись» от роста пластинок листьев.

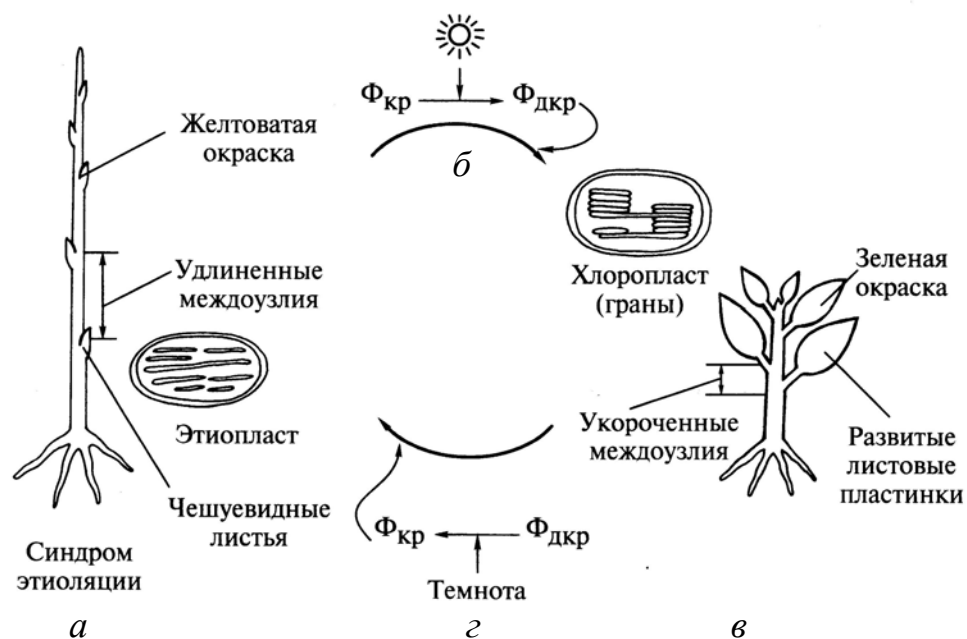


Рис. 7.19. Синдром этиоляции: *а* – этиолированное растение; *б* – процесс деэтиоляции, регулируемый светом через фитохромную систему; *в* – деэтиолированное растение; *г* – этиоляция, возникающая при недостатке света

Отсутствие света при прорастании является сигналом, что растение, вероятно, находится под землей, и проросток формирует апикальную петельку, защищающую меристему от возможных механических воздействий. В отличие от тройного ответа на этилен гипокотиль при этиоляции интенсивно растет.

В результате усиленного роста растение может оказаться в зоне с благоприятным освещением. Как только оно получит сигнал, что свет пригоден для фотосинтеза, у листьев появляется развитая пластинка (что контролирует фитохром *C*), рост междоузлий ингибируется, синтезируется хлорофилл, и пластиды превращаются в хлоропласты, разгибается апикальная петелька, а рост гипокотилия тормозится. Цепь этих процессов называют *деэтиоляцией*. Деэтиоляция характеризуется не только синтезом хлорофилла, но и экспрессией генов белков светособирающего комплекса.

Благодаря гидрофобным свойствам хлорофилл-связывающего белка тилакоиды, содержащие ССК, собираются в граны.

**Избегание тени.** Ситуация, когда растение попадает на свет, обогащенный ДК-лучами, заметно отличается от полной темноты. С одной стороны, дальний красный свет (как и просто красный) вызывает переход фитохрома  $A$  в форму  $\Phi(A)_{730}$  (это означает, что растение почувствовало свет). С другой стороны, дальним красным светом невозможно перевести  $\Phi(B)_{660}$  в  $\Phi(B)_{730}$ . Растение получает два противоречащих друг другу сигнала: от фитохрома  $A$  – о том, что свет есть, а от фитохрома  $B$  – о том, что этот свет не пригоден для фотосинтеза. Ответ зависит от «интегрирования» этих взаимно противоположных сигналов.

В природе интенсивный свет, обогащенный ДК, бывает под пологом растений. В нижних ярусах много дальнего красного, так как листья поглощают красные кванты в процессе фотосинтеза. Много дальнего красного – это сигнал о том, что рядом есть более высокие соседи. Однако есть надежда, что рядом обнаружится свободное светлое «окно», не занятое другими растениями.

Если растение получило положительный сигнал от фитохрома  $A$  и отрицательный от фитохрома  $B$ , развивается «синдром избегания тени». Для этого синдрома характерны черты как этиоляции, так и нормального развития на свету. Хлорофилл синтезируется, но его содержание меньше. Листовые пластинки формируются, но они не такие крупные, как при полном освещении. Удлинение междоузлий менее интенсивно, чем в темноте, но все же скорость роста выше, чем на прямом солнце. В результате образуются длинные побеги со слабо развитыми механическими тканями. Они легко полегают, при этом меристема побега оказывается на новом месте. Происходит новая «оценка ситуации», если по-прежнему в спектре много дальнего красного и мало красного, снова развивается побег с «синдромом избегания тени». Полное развитие фотосинтетического аппарата возможно только в том случае, когда на растение падает много красного света (и он не обогащен дальним красным). Тогда и от фитохрома  $A$ , и от фитохрома  $B$  приходят одинаковые сигналы о том, что свет есть и он пригоден для фотосинтеза. Образно можно назвать *фитохром  $A$*  «оптимистическим» рецептором, а *фитохром  $B$*  – «критиком» или «пессимистом».

Интересно, что поведение растений в тени заметно отличается у мутантов по фитохрому  $A$  и  $B$ . Если в растении поврежден фитохром  $B$ , оно развивает нормальный «синдром избегания тени» и, в конечном итоге, выживает. Мутанты по фитохрому  $A$  при интенсивном дальнем красном освещении сильно вытягиваются и погибают. Этот пример показывает, что отсутствие «оптимизма» бывает очень опасным, и даже смертельным при определенных внешних обстоятельствах. Растению нужно не только «уметь правильно и критически оценить ситуацию» с освещением (функция  $\Phi(B)$ ), но и «почувствовать положительные тенденции – понять», что свет все-таки есть и «жить стоит» (функция  $\Phi(A)$ ). Кроме того, синдром избегания тени регулируется фитохромами  $D$  и  $E$ .



**Регуляция прорастания семян.** Семена примерно 50% рудералов, среди которых немало сорняков, прорастают только после кратковременного освещения. Эти растения в природе занимают нарушенные места, поэтому зародышу важно определить, свободно ли место от растений-конкурентов. Если травостой сомкнут (место занято), семена не прорастают. В агроценозах основной экологический фактор – перекопка почвы. При этом семена сорняков могут оказаться как глубоко под землей, так и близко к поверхности. Семена, находящиеся глубоко в почве, не получают светового стимула и впадают в состояние покоя, образуя семенной фонд. Но стоит вынести такое семя на поверхность, как оно прорастает.

В регуляции прорастания заметную роль играет фитохромная система. Для восприятия светового сигнала необходимо набухание семян (если семя метаболически неактивно, фитохром не может передать информацию в ядро). Как это и следует из свойств фитохрома  $A$  и  $B$ , прорастание можно вызвать небольшим количеством «красных квантов» (через  $\Phi(B)$  и минорный  $\Phi(E)$ , тогда можно наблюдать К/ДК-обратимость. Освещение интенсивным ДК-светом также приводит к прорастанию (через  $\Phi(A)$ , причем обратить этот эффект не удастся.

На чувствительность семян к свету влияют условия выращивания материнского растения. Если арабидопсис вырастить на ярком свету, семена прорастут и в полной темноте. В зародыше при развитии на материнском растении фитохромная система получает достаточно красных лучей, и фитохромы переходят в форму  $\Phi_{730}$  (сигнал к прорастанию). После периода покоя семя прорастает без света. Если материнское растение выросло в тени других растений (или при недостатке света), фитохромы в зародышах остаются в форме  $\Phi_{660}$  и «ожидают» красных лучей – свет нужен для прорастания. Свойства фитохромной системы позволяют предложить приемы, снижающие прорастание сорняков на полях. Например, можно вспахивать и засеивать поле ночью, чтобы свет не попадал на семена сорняков (большинство культурных растений прорастают без света). Вспашка поля ночью показала, что засоренность снижается на 30–60% по сравнению с участком, вспаханным днем.

**Внутренние часы и фитохромная система.** В растениях важную роль играют *циркадные процессы*, связанные со сменой дня и ночи (от лат. *circa* – вокруг, *dies* – день). У растений существуют «внутренние часы», которые отмеряют время. Чтобы обнаружить их, использовали растение *Pharbitis nil* (семейство выюнковые). Цветение фарбитис зависит от длины светового дня: если день короче определенного интервала, то растение цветет, если длиннее – вегетирует. Уникальность физиологических свойств фарбитис в том, что цветение можно вызвать единственным днем «удачного» освещения. Проростки фарбитис, растущие в темноте, обрабатывали вспышками красного света. Если вторая вспышка света следовала через короткий промежуток после первой, то растения переходили к цветению. Как только интервал между двумя вспышками превышал критическую величину,



растение не давало цветков. Однако если давали вторую вспышку более чем через 24 ч, оно снова цвело ([рис. 7.20](#)).

Вероятно, у *фарбитис* есть «эндогенные часы», которые «запускаются» первой вспышкой света. С этого момента растение «отмеряет сутки». «Внутренние сутки» разбиты на фотофильный (*photos* – свет) и скотофильный (*skotos* – темнота) периоды. Если вторая вспышка приходится на фотофильный период, *фарбитис* цветет, а если на скотофильный – вегетирует. Фитохромная система взаимодействует с внутренними часами растения. Растение «подстраивает» циркадные ритмы по сигналам фитохромной и криптохромной систем. Эндогенный ритм часов и внешний ритм освещения интегрируются в единый сигнал, на который растение должно ответить адекватно (в частности, *фарбитис* запускает программу цветения или вегетативного развития).

В течение суток условия освещения меняются из-за того, что солнце находится под разными углами к горизонту. Когда оно в зените (угол, близкий к  $90^\circ$ ), спектр падающих лучей искажается незначительно. Однако при малых углах (раннее утро или поздний вечер) спектр оказывается обогащенным К- и ДК-квантами. Утром и  $\Phi(A)$ , и  $\Phi(B)$  активизируются, растение «просыпается». Вечером растения получают большую дозу дальних красных лучей, активизируется только  $\Phi(A)$ , тем самым фитохромная система «говорит» растению о времени суток. Часто ночью температура воздуха заметно ниже, чем днем, поэтому, получив фитохромный сигнал и «сверив» его с часами, растение «предпринимает превентивные меры» для защиты от холода. Если растения вовремя не получают сигнал о наступлении ночи, они не успевают адаптироваться к суточным колебаниям температуры и хуже растут.

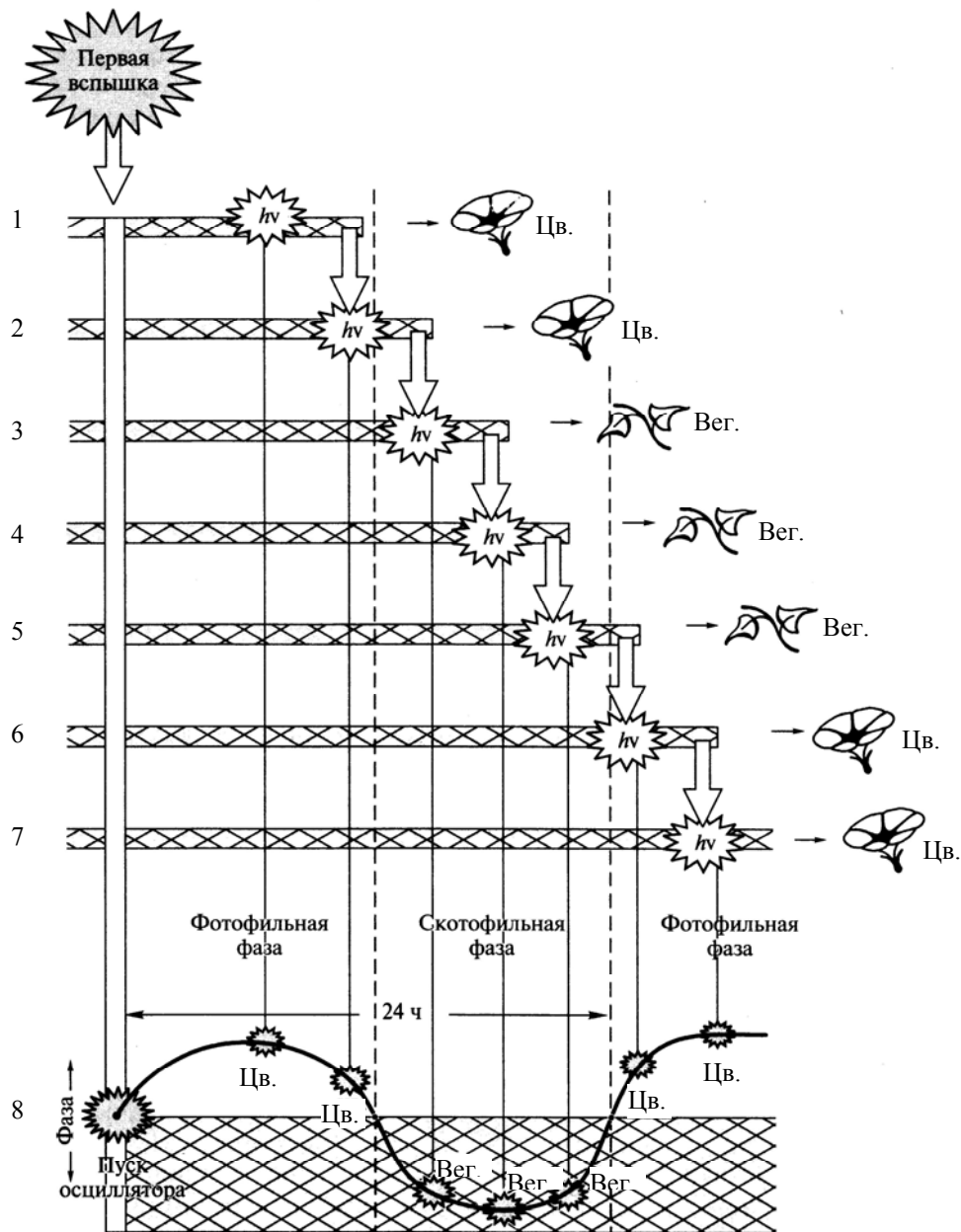


Рис. 7.20. Опыт, демонстрирующий наличие часов у *Pharbitis nil* (вьюнковые): 1, 2 – вторая вспышка приходится на I фотофильную фазу, растение цветет (цв.); 3–5 – вторая вспышка приходится на скотофильную фазу, растение вегетирует (вег.); 6, 7 – вторая вспышка приходится на II фотофильную фазу, растение цветет; 8 – схематическое изображение внутренних часов (эндогенного циркадного осциллятора);  $h\nu$  – вспышки света; длительность темного времени показана штриховкой

Важность фитохромов для циркадной температурной адаптации выяснили случайно. В целях повышения продуктивности лесных насаждений были получены трансгенные осины (*Populus tremula*), в геном которых был встроен ген фитохрома *A* под сильным промотором. Это привело к снижению эффекта «избегания тени» (растениям «казалось», что они постоянно получают ДК-свет высокой интенсивности). Ученые предложили высаживать осину более плотно, чтобы получить больше древесины с той же площади.

При посадке в грунт осины с измененной активностью фитохрома *A* не могут адаптироваться к суточным колебаниям температуры, страдают от ночных заморозков.

Таким образом, фитохромная система важна для восприятия растениями чередования дня и ночи. «Сверяя» фитохромные сигналы с «внутренними часами», растения «определяют» длительность дня и ночи (иногда с точностью до 10 минут!).

#### 7.4.3. Фоторецепция в синей области спектра: криптохром и фототропин

**История изучения фоторецепции в синей области спектра.** В 1881 году Ч. Дарвин в опытах с фототропизмом у канареечной травы (*Phalaris*) показал, что экран из раствора бихромата калия, не пропускающий синий свет, полностью снимает эффект фототропизма. В 1883 году немецкий физиолог растений Ю. Сакс провел опыты с применением цветных стекол и различных растворов, чтобы более полно оценить спектральные характеристики света, вызывающего реакцию фототропизма. В итоге стало понятным, что растение «чувствует» синий свет (красный не вызывал фототропизма).

В дальнейшем эта часть спектра была сужена до 400–500 нм. Было показано, что от синего света зависят и другие физиологические ответы: синтез каротиноидов, антоцианов, устьичные движения. Вызванный синим светом ответ невозможно было обратить квантами света с другой длиной волны. Значит, у растений есть еще один фоторецептор, отвечающий за восприятие синей части спектра. Методы, которые применяли для изучения фитохрома, оказались почти неприемлемыми для нового рецептора, выделить и охарактеризовать его не удавалось вплоть до конца XX века. Гипотетический фоторецептор был назван *криптохромом* (от греч. *cryptos* – скрытый).

Наложение физиологического спектра действия при фототропизме на спектры поглощения пигментов давало расплывчатые результаты: на роль криптохромов претендовали флавины, птерины и производные каротиноидов. Более того, в синей части спектра есть максимумы поглощения и у фитохромобилина, и у хлорофиллов. По объективным причинам изучение восприятия синего света оказалось сложной проблемой.

В 1993 году проблему криптохрома смогли решить А. Р. Кашмор и М. Ахмад. Они отобрали среди мутантных растений арабидопсис те, которые давали удлинённый гипокотиль как в темноте, так и на свету. Оказалось, что часть мутантов не реагирует на синий свет (гипокотиль длинный), а на красном свету гипокотили этих мутантов короткие. Очевидно, что фитохромная система работает нормально, а мутанты имеют нарушения в криптохромной системе. Удалось выделить мутации, как по биосинтезу хромофора, так и по белковой части криптохрома, клонировать эти гены и получить их полную последовательность.

**Криптохром – рецептор синего света, локализованный в ядре и цитоплазме.** У *Arabidopsis* криптохромная система представлена двумя белковыми комплексами: *CRY1* и *CRY2*. У папоротника *Adiantum capillus-veneris* обнаружено 5 генов, кодирующих различные криптохомы. Судя по последовательности нуклеотидов, белки криптохромов родственны ДНК-фотолиазам. Эти ферменты позволяют репарировать сшивки, возникающие в ДНК вследствие облучения ультрафиолетом. ДНК-фотолиаза несет две хромофорные группы: флавин и птерин (или деазафлавин). Восстановление ДНК фотолиазами возможно только в присутствии света.

Криптохромы обладают консервативным участком с двумя карманами для хромофорных группировок и дополнительным участком на С-конце. По-видимому, именно С-концевой домен приводит к изменениям свойств фотолиазы и превращению в фоторецептор (рис. 7.21).

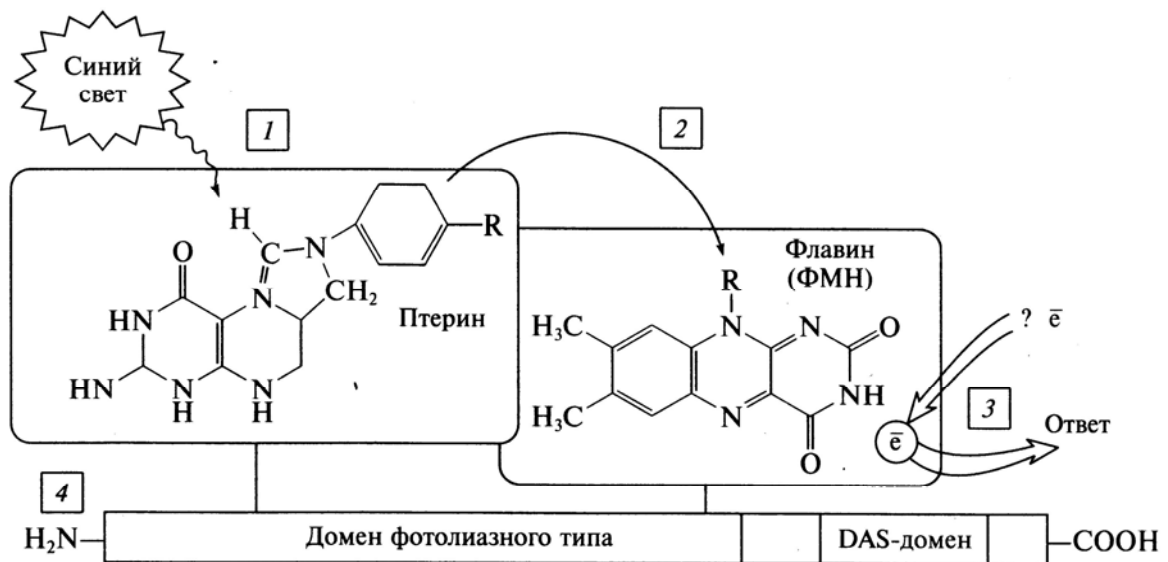


Рис. 7.21. Структура криптохрома: 1 – получение кванта синего света птериновым ядром; 2 – передача возбуждения на ядро флавина; 3 – ответ в форме редокс-реакции; 4 – функциональные домены белковой части криптохрома

Криптохром не может непосредственно восстанавливать ДНК, но первичные акты захвата света у него такие же, как у фотолиазы. Птерин (метенилтетрагидрофолат) функционирует как светособирающий хромофор. При попадании синего кванта света возбуждение передается в реакционный центр криптохрома – на молекулу *FAD*. Наличие двух хромофоров объясняет тот факт, что физиологический спектр действия криптохрома совпадает как со спектром флавинов, так и со спектром птеринов. *FAD* в составе криптохрома находится в стабильной семихинонной форме (он частично восстановлен и легко отдает электроны). Семихинон *FAD* поглощает не только в синей, но и в зеленой части спектра. Таким образом,

физиологический ответ вызывает не только синий, но и интенсивный зеленый свет.

Получив квант света, электрон флавинового ядра возбуждается, т. е. переходит на более высокую орбиталь, и редокс-потенциал резко изменяется. Возбужденный флавин – сильный восстановитель. В настоящий момент существует три гипотезы работы криптохрома.

1. Происходит самовосстановление молекулы криптохрома с изменением ее конформации, что активизирует вторичные мессенджеры.

2. В систему передачи сигнала вовлечен промежуточный редокс-партнер.

3. Партнеру передается не электрон, а возбуждение квантом синего света, и этот квант приводит в действие еще одну хромофорную молекулу. Если эффективного взаимодействия не состоялось, возбужденное флавиновое ядро теряет энергию (флуоресцирует).

На свету криптохром 1 (*CRY1*) связывается с фитохромом *A*, и криптохром фосфорилируется. Очевидно, без фосфорного остатка криптохром не активен. Фитохром *A*, получив из окружающей среды сигнал о том, что «свет в принципе есть», активизирует систему синего света. Криптохром *in vitro* взаимодействует с некоторыми фосфатазами, изменяя их активность. Возможно, каскад фосфорилирования/дефосфорилирования – один из механизмов передачи сигнала. Криптохром локализован в ядрах, что неудивительно: он очень похож на ДНК-фотолиазы, которые, по определению, имеют внутриядерную локализацию. Предполагают светозависимый транспорт криптохрома через ядерную мембрану. Вторичные мессенджеры криптохромной системы также располагаются в ядре и участвуют в регуляции экспрессии генов.

Криптохром 2 пока еще недостаточно изучен. Белковая часть молекулы на *N*-концевом участке похожа на криптохром 1 (соответствует доменам, связывающим хромофоры), отличаются только *C*-концевые участки. Белок *CRY2* связывает *FAD*. При мутациях *CRY2* повреждаются ответы на синий свет низкой интенсивности, а если нарушена работа криптохрома 1, то растения не реагируют на высокую интенсивность синего света. Как и в системе фитохромов, у криптохромов есть разделение по функциям: криптохром 1 дает приблизительный сигнал (есть много света в синей и соседней зеленой областях), а криптохром 2 сигнализирует более точно (низкая интенсивность синего).

Благодаря спектральным свойствам дополнительного пигмента – птерина, – криптохромы поглощают кванты не только синей области, но и из ближнего ультрафиолета (*UV-A*), поэтому криптохромы рассматривают как возможные УФ-фоторецепторы. Одним из механизмов, защищающих организм от жесткого излучения, является биосинтез антоцианов и каротиноидов. Неудивительно, что их синтез контролируется криптохромами. От криптохромного сигнала зависит экспрессия генов халконсинтазы, халконизомеразы, дигидрофлавонолредуктазы и других



ферментов биосинтеза антоцианов. Заметим, что для биосинтеза антоцианов необходимы как фитохромная, так и криптохромная системы.

Криптохромная система участвует в «настройке» внутренних часов в растении и получении фотопериодического стимула, однако она не является главной. Интересно, что у животных (мыши, дрозофилы) также обнаружены криптохромы. У животных криптохромы играют основную роль в фотопериодической регуляции сезонных форм поведения. Криптохромный сигнал замедляет рост гипокотилия (или междоузлий) на свету, помогает фитохрому контролировать процессы деэтиоляции. Обе фоторецепторные системы, действующие в ядерном компартменте, – криптохром и фитохром – в заметной мере дополняют друг друга. Пути передачи сигнала от этих систем, по-видимому, сходятся и взаимодействуют, что приводит к интеграции информации о физиологически важных областях спектра – синей и красной.

**Фототропин – мембранный рецептор синего света.** В 1995 году был изучен первый мутант арабидопсис из серии *non phototropic hypocotyl – nph 1*. У мутанта нарушен только фототропический ответ (как положительный, так и отрицательный), но не нарушены другие светозависимые реакции (деэтиоляция, циркадные ритмы и т. д.). Белок был назван *фототропином 1 – PHOT 1*, или *NPH 1* – по названию мутации.

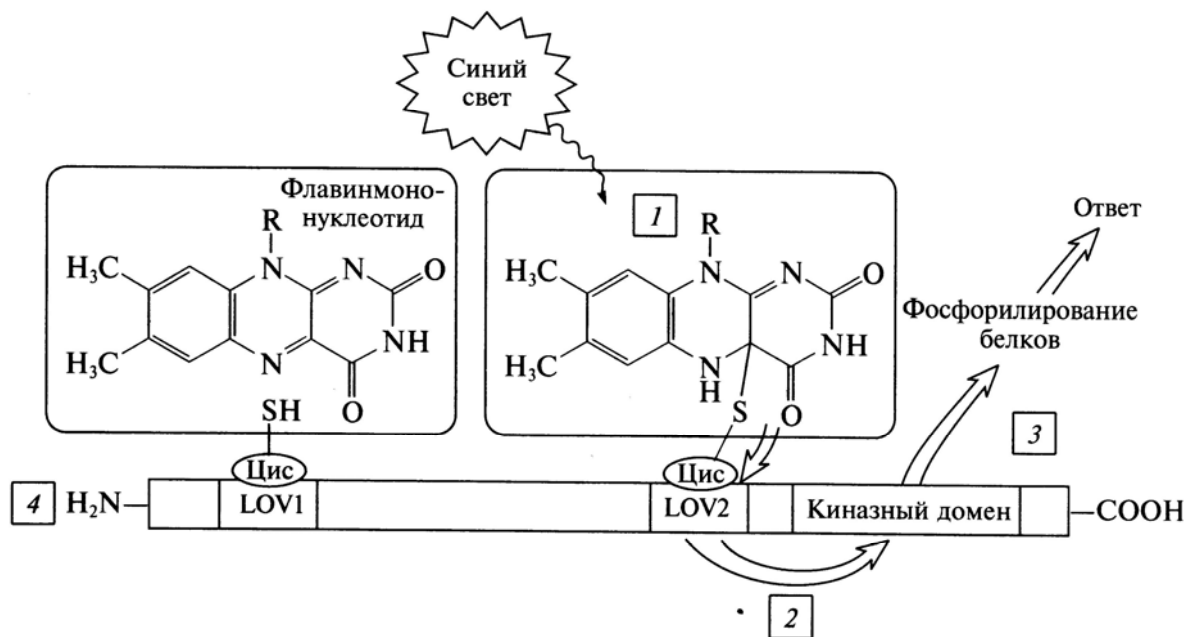


Рис. 7.22. Структура фототропина:

- 1 – фотоактивация синим светом одного из двух флавиновых ядер;
- 2 – передача возбуждения в форме изменения конформации на киназный домен;
- 3 – фосфорилирование вторичных мессенджеров;
- 4 – функциональные домены белковой части фототропина

Фототропин – ассоциированный с мембраной белок, хотя в его аминокислотной последовательности нет протяженных гидрофобных



участков. Очевидно, он входит в мембранные белковые комплексы. В последовательности фототропина 1 можно выделить два *LOV*-домена (*light – oxygen – voltage*) (рис. 7.22). Они встречаются в рецепторных белках, ответственных за фототропизм, хемотропизм (по градиенту кислорода или редокс-потенциала) и потенциалзависимые мембранные процессы. *In vitro* фототропин 1 связывает *FMN*, причем каждый *LOV*-домен связывает только одно флавиновое ядро. Очевидно, в клетке также происходит связывание *FMN*. По-видимому, фототропин 1 является протеинкиназой, т. е. участвует в каскаде фосфорилирования. После кратковременного освещения белок *PHOT 1* на освещенной стороне фосфорилируется больше, чем на теневой. Это ведет к быстрому первичному изгибу.

У *Arabidopsis* найден и другой белок – фототропин 2 (*PHOT 2*). Он немного короче, чем *PHOT 1*, но при нарушении его работы фототропизм также пропадает. Предполагают, что в мембране оба фототропина образуют гетеродимер, и нарушение работы как *PHOT 1*, так и *PHOT 2* вызывает распад активного комплекса и нарушение фототропизма.

Мутанты по криптохромной системе (*CRY 1* и/или *CRY 2*) обладают первичными реакциями фототропизма, однако у них снижена амплитуда фототропического ответа. Того же эффекта можно добиться нарушением гена фитохрома *A*. Это означает, что фито- и криптохромная системы нужны на поздних стадиях фототропического ответа, но направление изгиба определяют фототропины 1 и 2.

**Суперхром – «кентавр с головой фитохрома и туловищем фототропина».** У папоротника *Adiantum capillus-veneris* был найден ген, гомологичный как фитохромам, так и фототропинам. Выделенный *in vitro* белковый продукт этого гена связывает фитохромобилин и показывает К/ДК-обратимость. Наличие *LOV*-доменов заставляет предположить, что он связывается также и с *FMN*. «Двойной» фоторецептор был назван *суперхромом*. Как и фототропин, суперхром обладает протеинкиназной активностью.

Таким образом, если у одних растений фототропин взаимодействует с фитохромами опосредованно, то у *Adiantum* проблема взаимодействия красного и синего световых сигналов решена на уровне «гибридного» фоторецептора.

Таким образом, растения обладают сложной и совершенной системой рецепции и анализа падающего на них света. Эта система полностью еще не изучена, хотя ее основные элементы уже известны.

## 7.5. Фотохимические реакции в нуклеиновых кислотах, белках и липидах

Разрушающее канцерогенное и мутагенное действие света на живые организмы связано, прежде всего, с действием ультрафиолета на нуклеиновые кислоты, особенно на ДНК. Поэтому в данной области проделано огромное число разнообразных исследований. Основные результаты этих исследований и изложены в настоящем параграфе.

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.

Помимо нуклеиновых кислот и белков в данном параграфе рассмотрено действие света на липиды. Это связано, прежде всего, с их ролью в формировании клеточных мембран. Кроме того, липидное окружение мембран сильно влияет на инактивацию мембранных белков.

### 7.5.1. Действие ультрафиолетового света на нуклеиновые кислоты

**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  $\pi$ -электронная система колец ( $\pi$ – $\pi^*$ -переходы). Полосы поглощения оснований (максимум около 260 нм), сформированные  $\pi$ – $\pi^*$ -переходами, характеризуются высокой молярной экстинкцией.

Положение спектров поглощения оснований сильно зависит от pH 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 нуклеиновых 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. Нуклеиновые кислоты (а также основания,

нуклеозиды, нуклеотиды) при комнатных температурах и нейтральных pH практически не люминесцируют.

**Миграция энергии.** Отсутствие флуоресценции при физиологических условиях 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 температуре 77 °К или ниже (табл. 7.1).

Таблица 7.1

Параметры флуоресценции и фосфоресценции нуклеотидов при 77 °К

Основание	Флуоресценция			Фосфоресценция	
	Квантовый выход	$\tau_{\text{изм}}, \text{нс}$	$\tau_{\text{ест}}, \text{нс}$	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	–	–

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.

**Типы фотохимических реакций.** Прежде всего, необходимо подчеркнуть, что пуриновые основания приблизительно на порядок более фоторезистентны, чем пиримидиновые. Поэтому нуклеиновые 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; внутри- и межмолекулярные сшивки ДНК; сшивки ДНК – белок; разрывы сахаро-фосфатного остова нуклеиновых кислот.

**Димеризация Тимина.** В 1958 году Бьюкерс, 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.

Реакция фотодимеризации заключается в разрыве 5,6-двойной связи у обоих партнеров и образовании циклобутанового кольца (рис. 7.23).

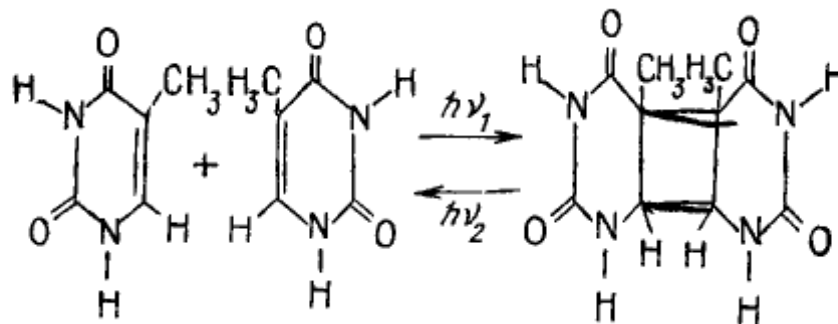


Рис. 7.23. Димеризация тимина

Как прямая, так и обратная реакции имеют чисто фотохимическую природу и не требуют термической активации: в замороженных растворах тимина в интервале от 0 до  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  скорость реакций не изменяется, т. е.  $Q_{10} = 1$ ,  $E_{\text{акт}} = 0$ .

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.

Вследствие бимолекулярного характера реакции фотодимеризации ее квантовый выход сильно зависит от концентрации и степени взаимоориентации 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  $77\text{ }^{\circ}\text{K}$  протекает в 5 раз быстрее, чем при  $298\text{ }^{\circ}\text{K}$ . 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 тиминовых остатков.

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.

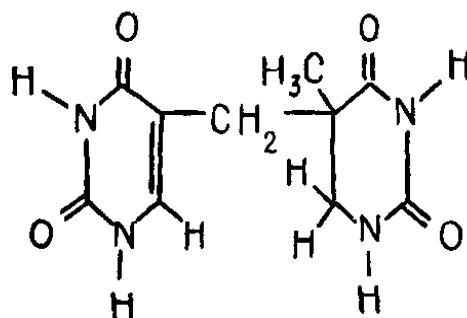
Однако часть димеров может образовываться «синглетным» путем.

Все же к настоящему времени наиболее аргументирована точка зрения о преимущественно «триплетном» образовании димеров в ДНК при физиологических условиях.

Замыкание двух ковалентных С–С-связей между двумя молекулами тимина происходит в *пятом и шестом* положениях. 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 межтиминовых связей благодаря «электронным вакансиям» (высокой спиновой плотности).

Итак, большинство экспериментальных данных свидетельствует о *триплетном механизме образования тиминовых фотодимеров*. Тем не менее вероятность протекания реакции димеризации через синглетное состояние остается достаточно высокой.

**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.

**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, транспортной и рибосомальной РНК:

Из четырех теоретически предсказанных стереоизомеров урацила при облучении образуется в основном *цис*-изомер.

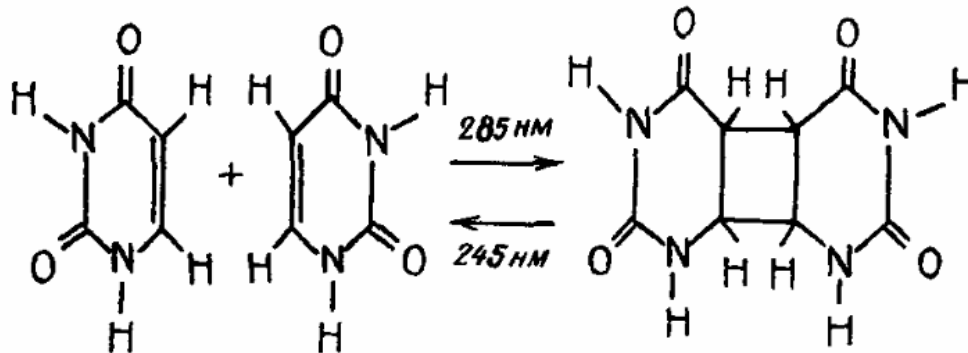
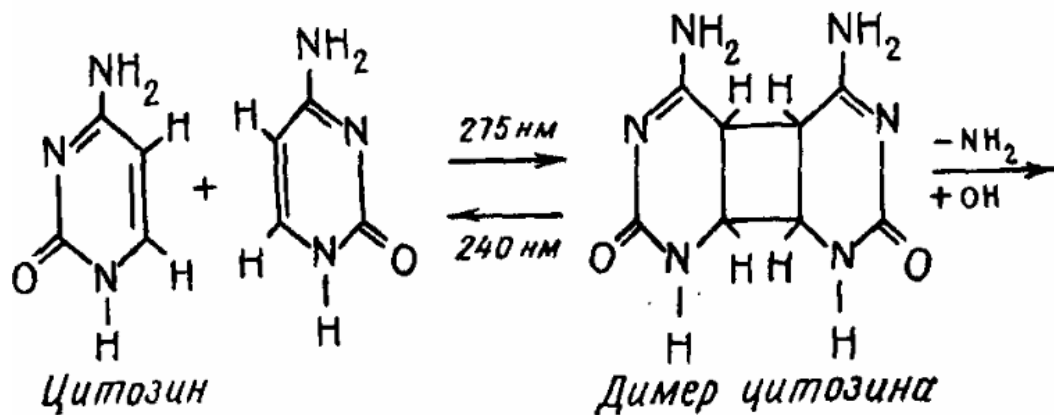


Рис. 7.24. Димеризация урацила

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 (рис. 7.24). Скорость бимолекулярной, но одноквантовой реакции фотодимеризации урацила обнаруживает явно выраженную зависимость от его концентрации в растворе, возрастая 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 сенсбилизаторов.

**Димеризация цитозина.** Фотодимеризация цитозина обнаружена при УФ-облучении цитозина, цитидил-цитидина, полиуридилцитидиловой кислоты и ДНК:

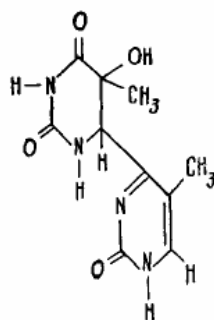




Квантовый выход димеризации возрастает в 9 раз при увеличении pH от 3,0 до 6,5. Фотодимеры цитозина под действием коротковолновых лучей мономеризуются. Димеры цитозина неустойчивы и в темноте могут мономеризоваться или дезаминироваться, превращаясь в урациловые димеры. Вследствие высокой лабильности цитозиновых димеров их пространственную структуру установить до сих пор не удалось.

**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 темновым дезаминированием цитозина до урацила в составе смешанного димера.

**Пиримидиновые аддукты.** Кроме циклобутановых пиримидиновых димеров при УФ-облучении нуклеотидов могут образовываться различные гомо- и гетеродимеры, получившие название пиримидиновых аддуктов:

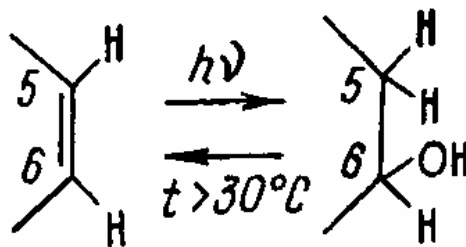


При этом, например, из двух тиминовых оснований образуется нециклическая димерная структура, характеризующаяся иными, чем у тимина,

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.

**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. Скорость фотогидратации уменьшается при замене  $\text{H}_2\text{O}$  на  $\text{D}_2\text{O}$ . Реакция гидратации фотоннеобратима. Поэтому при длительном или интенсивном ультрафиолетовом облучении (240–270 нм) полиуридиловой кислоты практически обнаруживаются только гидраты.

**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* (лаким-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 ( $\text{R}-\text{NH}_2 \rightarrow \text{HR}'=\text{NH}$ ) 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.

**Разрывы полинуклеотидной цепи.** Разрывы сахара-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.

**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 не способна 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.

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.

**Сшивки нуклеиновая кислота – белок.** Первым косвенным свидетельством фотохимического образования ковалентных сшивок между ДНК и белком было обнаруженное ухудшение экстрагируемости ДНК из *E. coli*, подвергнутой УФ-облучению. После обработки лизированных клеток трипсином экстрагируемость ДНК полностью восстанавливалась.

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*. При облучении полирибоуридилевой, полирибоцитидиловой, полидезоксцитидиловой, полидезокситимидиловой кислот, РНК и ДНК с цистеином происходит его химическое комплексообразование с этими полинуклеотидами, что и определило 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 свою очередь, высокую реакционную способность при образовании сшивок с аминокислотами проявляет и тимин.

Итак, в комплексе ДНК – аминокислота ковалентная связь образуется с участием отдельных оснований и прежде всего тимина и урацила.

Предполагается, что аминокислоты белков через SH- и OH-группы присоединяются к пятому (или шестому) углеродному атому основания.

**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. 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 *t*РНК, локализованные вне антикодона, все же приводят к инактивации – нарушению комплементарного связывания антикодона *t*РНК с кодоном *m*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 *r*РНК.

**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, *t*РНК и *r*РНК. При локализации повреждения в *m*РНК ингибируется процесс связывания ее с рибосомами и *t*РНК, утрачивается трансляционная активность, искажается матричный смысл. Наконец, при прямом фотоповреждении *t*РНК подавляется ее акцепторная активность к аминокислотам, изменяется структура антикодона и способность комплексоваться с рибосомами и кодонами *m*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 облучения.

Считается, что за 30% всех видов УФ-поражений в биологических объектах ответственны димеры тимина. В конечном счете парциальный вклад (П) каждого типа фотопродуктов в биологический эффект будет определяться тремя факторами: *поперечным сечением поглощения ( $s$ )*, *квантовым выходом фотохимической реакции ( $\phi$ )* и *вероятностью биологической реализации элементарного повреждения ( $P$ )*:

Первый фактор, зависящий от нуклеотидного состава нуклеиновых кислот и их конформации, наименее variabelен (плюс-минус десятки процентов).

Более лабилен квантовый выход отдельных реакций. Фотохимические реакции в полинуклеотидах нельзя рассматривать как сумму химических реакций моонуклеотидов, нуклеозидов и азотистых оснований. Наконец, фотохимия нуклеиновых кислот зависит не только от их состава, но и от конформации макромолекулы (микроокружения). 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 (мутагенез, 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.

### 7.5.2. Действие ультрафиолетового света на белки

**Характеристика электронно-возбужденных состояний белковых хромофоров.** Поглощение света *триптофаном* и его остатками в составе полипептидной цепи белка (триптофанылы) 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.

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.

Основной поглощающей группировкой в молекуле *тирозина* является фенольное кольцо.

Спектр поглощения тирозина представлен двумя по I полосами с максимумами при 275 нм ( $\epsilon = 1250$ ) 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 фенольным 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, 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  $\pi$ -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.

**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, инаktivация 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.

**Роль отдельных хромофоров в фотоинактивации белков.** Основную информацию о природе акцепторов биологически активного света дает метод спектров действия.

В спектрах действия инаktivации самых разнообразных белков отчетливо представлена полоса поглощения ароматических аминокислот при 280 нм. Непосредственное 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 фотоллиза триптофанилов в них.

Вклад фотохимии цистина проявляется в увеличении поперечного сечения инаktivации богатых цистином белков в области 250 нм, где парциальное поглощение цистина сравнимо с поглощением ароматических аминокислотных остатков. 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» фотоинаktivация, только при коротковолновом (240–260 нм) – «цистиновая». В соответствии с этим белки, инаktivированные коротко- и длинноволновым УФ-облучением, судя по данным седиментационного анализа, различаются конечным конформационным состоянием.

Исследования показали, что к инаktivации приводит разрушение не всякого, а только *строго определенного* триптофанового или цистинового остатка. Таким образом, именно триптофан и цистин имеют первостепенное значение для фотоинаktivации белков.

Иные возможные элементарные фотохимические повреждения в белке – разрывы полипептидной цепи, фотоллиз других алифатических, гетероциклических и ароматических аминокислот – не вносят решающего вклада в инаktivацию.

Несущественна также 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-света, 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.

**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.

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 каждых семи квантов, высвечиваемых триптофаном, три кванта возникают в результате миграции энергии от тирозиновых остатков.

В отличие от тирозин-триптофановой тирозин-тирозиновая 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 политирозина.

Более сложная картина наблюдается в случае триптофан-триптофановой миграции энергии. Поскольку длинноволновая полоса поглощения триптофана сформирована двумя по-разному ориентированными осцилляторами, эффект деполяризации может быть вызван не только миграцией энергии, но и изменением взаимоориентации и вклада различных осцилляторов в поглощение, обусловленным включением триптофана в состав белка.

Эффективность миграции энергии существенно падает при уменьшении времени жизни флуоресценции донора энергии. В связи с этим показательны три серии опытов.

1. При повышении температуры от 20 до 30°C 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%.

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 *NAD*  $H_2$ , *FAD*ом, 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 белок – внешний хромофор *уменьшает квантовый выход фотохимического повреждения белкового носителя и может сенситивизировать в акцепторах фотохимические реакции*, ответственные за многие фотобиологические эффекты.

**Триптофановая фотоактивация.** Триптофановая фотоинаktivация белков в растворе и в пленке при облучении УФ-светом с длиной волны 260–320 нм осуществляется по *одноквантовому, одноударному* 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 хромофоров. Этот вывод следует из пропорциональности между концентрацией синглетных возбужденных состояний и степенью инактивации. Миграционная «откачка» энергии с синглетных уровней триптофанилов у трипсина на краситель флуоресценции, а у фибриногена – на диметил-аминонафталинсульфанилхлорид сопровождается соответствующим уменьшением квантового выхода инактивации белков. В противоположность этому изменение заселенности триплетных уровней триптофанилов белка в результате индуктивно-резонансной миграции энергии триптофанил  $\rightarrow$  хризоидин и сульфонамид  $\rightarrow$  триптофанил не влияет на фоточувствительность белков. Более того, даже при низких температурах (77°K), 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.

Итак, при физиологических условиях именно синглетное возбужденное состояние триптофанила в белках является, по-видимому, непосредственным предшественником фотопродуктов, которые приводят к инактивации макромолекулы.

Было 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 (pH); 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 формилкинурунин, кинурунин, окскинурунин и оксиантраниловая кислота – конечный стабильный продукт фотодеградации 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.

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.

Полученные данные свидетельствуют, что *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  $\pi$ -электрона азота индольного кольца значительно меньше потенциала ионизации  $\pi$ -электронов. Этот потенциал еще больше уменьшается в результате образования водородной связи с участием иминогруппы. Поэтому наиболее вероятно, что электрон отрывается от азота индольного кольца.

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.

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 инициируется кооперативный процесс денатурации, которая и приводит к потере ферментативной активности. В большинстве случаев непосредственной причиной инактивации являются *конформационные изменения макромолекулы*. 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*.

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* триптофана (около 100 ккал/моль), ведущей к множественным разрывам водородных и иных связей.

Следовательно, отмеченная 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.

**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 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. В белках квантовый выход фотолиза цистина 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.

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, 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.

Как и для триптофана, для цистина характерна *гетерогенность* по fotocувствительности даже в пределах одной и той же макромолекулы белка. 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.

**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, было обнаружено, что свет, поглощаемый триптофаном, может сенсibilизировать разрыв пептидной связи.

**Роль конформационного фактора в фотоинактивации белков.** Конформационный фактор оказывает существенное влияние на fotocувствительность 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 fotocувствительности ферментов и комплексов фермент – субстрат, фермент – гормон, а также температурных 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 fotocувствительности не только в растворе, но и в клетке.

**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, fotocувствительность белков в составе биологических мембран и в растворе должны различаться.

Наглядным примером мембранного контроля fotocувствительности ферментов является изменение поперечного сечения инактивации эритроцитарной ацетилхолин-эстеразы после предрадиационной обработки

мембран фосфолипазами *A*, *C* 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.

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 синапсомальных мембран. По мере УФ-облучения детергентоустойчивость эритроцитарных и синапсомальных 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.

Наряду с изменением каталитических параметров после УФ-облучения наблюдается модификация и физико-химических свойств мембранного фермента. В случае эритроцитарной ацетилхолинэстеразы зарегистрированы, например, изменения характера рН-зависимости ее активности, константы ингибирования прозеринном, термостабильности, энергии активации ферментативной реакции.

**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. 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), 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 – а-кетобутиратом ( $\lambda = 320$  нм).

### 7.5.3. Действие ультрафиолетового света на липиды

К липидам относится широкий класс относительно низкомолекулярных соединений, обладающих более или менее выраженными гидрофобными свойствами и плохорастворимых 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 существует 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. Квантовый выход такой реакции значительно превышает единицу, например 90 для этиллинолеата. Это означает, что механизмы фотоокисления и хорошо изученного цепного, свободнорадикального автоокисления липидов близки. Их единство вытекает также из сходства кинетики авто- и фотоокисления ненасыщенных жирных кислот.

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 инициироваться 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 все же 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.

Таким образом, приведенный в параграфе материал показывает, что действие УФ-излучения на живые организмы связано при действии на ДНК, главным образом, с образованием пиридимидиновых димеров, особенно тиминовых димеров.

Действие на белки реализуется главным образом через остатки ароматических аминокислот, прежде всего таких как *триптофан* и в значительно меньшей степени *тирозин* и *фенилаланин*. Данные аминокислоты, а также цистин ответственны за функционально активное поглощение света.

Действие УФ-света реализуется в большой степени через перекисное окисление липидов, оно может инициироваться не только ультрафиолетовым, но и видимым светом, хотя в гораздо меньшей степени.

## 7.6. Фотореактивация ДНК и фотодинамическая терапия

### 7.6.1. Репарация ДНК и фотореактивация

**Исправление повреждений ДНК: системы репарации.** Известно, что и в реплицирующейся, и в нереплицирующейся ДНК могут возникать ошибки,

которые приводят к генным мутациям. В живых клетках имеется множество систем, исправляющих такие ошибки. Такие системы крайне важны для поддержания генетической целостности организмов и их выживания. Этот тип репарации обеспечивает прямое восстановление исходной структуры ДНК или удаление повреждения. Широко распространенная система репарации такого рода – *фотореактивация пиримидиновых димеров*. Кроме нее к этому типу относятся: репарация ДНК за счет 3'-5'-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы, репарация одноцепочечных разрывов ДНК с помощью полинуклеотидлигазы, а также генетическая репарация повреждений, вызванных алкильными или металльными группами, путем удаления этих групп специфическими ферментами.

Биологические объекты обладают чувствительностью к свету, так как свет поглощается многими эндогенными хромофорами, например зрительными пигментами, белками, нуклеиновыми кислотами. Если в организм человека или животных извне попадают экзогенные хромофоры, например какие-либо красители, поглощающие видимый или ультрафиолетовый свет, то светочувствительность тканей резко возрастает. Соединения, повышающие чувствительность биологических объектов к свету, называются фотосенсибилизаторами.

Обычно фотосенсибилизация – явление нежелательное, приводящее к световым ожогам кожи и глаз при таких малых дозах облучения, которые в обычных условиях не оказывают повреждающего действия. Однако иногда совместное воздействие света и фотосенсибилизаторов вызывает положительные терапевтические эффекты. На основе таких комбинированных воздействий света и красителей на организм человека создаются методы фотохимиотерапии.

С древнейших времен для лечения кожных заболеваний применяются псоралены – фотосенсибилизаторы растительного происхождения, повышающие чувствительность биологических тканей к длинноволновому ультрафиолету. В настоящее время наиболее известны два вида фотохимиотерапии. В одном из них используют порфирины и видимый свет для уничтожения злокачественных новообразований – фотодинамическая терапия. В другом случае применяют псоралены и длинноволновое ультрафиолетовое излучение для лечения кожных заболеваний (ПУФА-терапия). Термин ПУФА составлен из первых букв слов «псорален» и ультрафиолет диапазона *A* – УФ-*A*. Разделение ультрафиолетовой области спектра на диапазоны *A* (320–400 нм), *B* (280–320 нм) и *C* (длины волн короче 280 нм) введено в медицине на основе различной чувствительности кожи к этим видам излучения. Наименее чувствительна кожа к УФ-*A*-излучению.

Фотодинамическая терапия – относительно молодая область медицины, она возникла в начале XX века, бурное развитие получила в последние два десятилетия и сейчас начинает применяться в клинической практике. ПУФА-терапия давно и широко используется во всем мире, в том числе и в нашей стране. К сожалению, наряду с положительными эффектами оба вида терапии вызывают нежелательные, побочные эффекты и нуждаются в



усовершенствовании. Существуют два взаимно дополняющих направления развития фотохимиотерапии: эмпирическое, основанное на случайно установленных фактах, и дедуктивное – на основе анализа фундаментальных представлений о механизме фотосенсибилизированных реакций.

**Фотореактивация.** Как известно, облучение ультрафиолетом вызывает образование в молекулах ДНК пиримидиновых димеров. При исследовании мутагенности УФ было обнаружено множество типов репарации повреждений ДНК. Первое открытие, касающееся репарации индуцированных УФ нуклеотидных сшивок сделал в 1949 году Альберт Кельнер, который назвал такую репарацию *фотореактивацией*. Он показал, что повреждения ДНК, индуцированные у *E. coli* ультрафиолетом, можно частично восстановить, если после облучения поместить бактерии под синий свет. Затем было обнаружено, что фотореактивная репарация зависит от температуры. Значит, индуцированная видимым светом репарация повреждений ДНК представляет собой ферментативные реакции.

Дальнейшее изучение фотореактивации показало, что репарация зависит от активности фермента, названного *ферментом фотореактивации (PRE)*, который выделили затем из экстракта клеток *E. coli*. Этот фермент расщепляет ковалентные связи между остатками тимидина в тиминовых димерах и восстанавливает неповрежденную структуру ДНК ([рис. 7.25](#)). Несмотря на роль этого фермента в исправлении индуцированных УФ мутаций, клетки *E. coli* могут без него обойтись, поскольку нуль-мутация в гене, кодирующем *PRE*, нелетальна. Фермент фотореактивации не обнаружен у человека и других эукариот, которые используют другие механизмы репарации повреждений ДНК, индуцированных ультрафиолетом.

Таким образом, было установлено, что эффективность фотореактивации ([рис. 7.25, а](#)) связана с действием фермента – дезоксирибозидпиримидинфототиазы, представляющего собой полипептид, ассоциированный для его активности с небольшой молекулой РНК (10–15 нуклеотидов). Этот фермент расщепляет димеры двух соседних пиримидинов циклобутанового типа в одной цепи ДНК, образующиеся под влиянием УФ-лучей. Каждый из димеров задерживает репликацию примерно на 10 секунд. Фермент присоединяется к ним и в темноте, и на свету, но реакция расщепления связей, объединяющих две молекулы пиримидинов, энергетически зависит от действия видимого света с большей длиной волны. На свету пиримидиновые димеры расщепляются, за счет разрыва ковалентных связей происходит мономеризация, и таким образом восстанавливается нативная структура ДНК. К эффективному диапазону (365–490 нм) относятся наиболее длинноволновые УФ-лучи (365–390 нм) и примыкающие к ним видимые синие лучи (435–495 нм). Наибольшая эффективность фотореактивации отмечена для голубой части видимого спектра. Если же необходимо исключить возможность реактивации, то



опыты следует проводить в более длинноволновой части спектра, начиная с желтого света (570–590 нм).

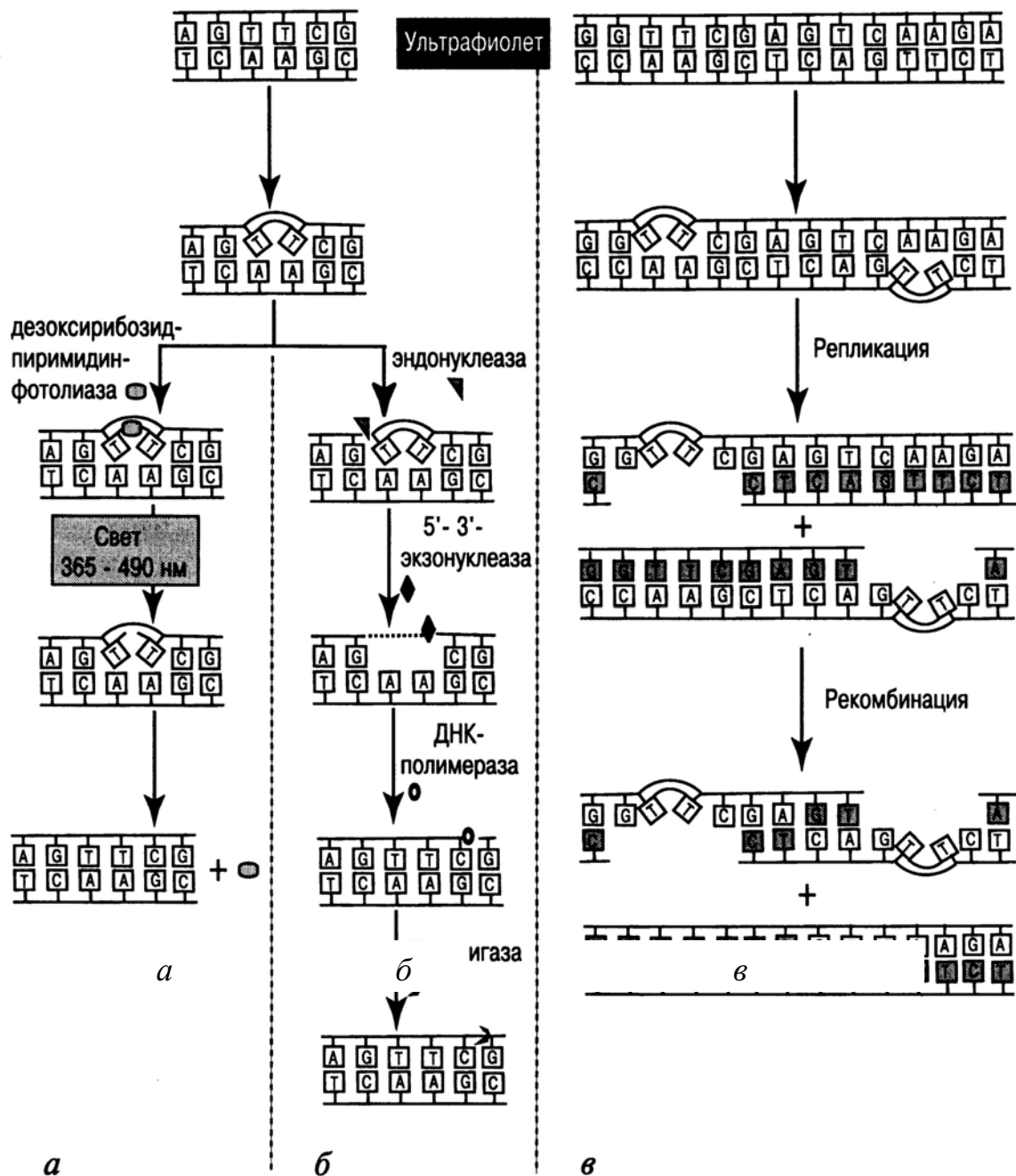


Рис. 7.25. Механизмы репарации ДНК-повреждений:  
*а* – фотореактивация; *б* – эксцизионная репарация;  
*в* – пострепликативная репарация

За одну минуту молекула фототиазы может расщепить 2,4 димера. У *E. coli* система фотореактивации удаляет до 90% пиримидиновых димеров и контролируется одним геном – *phr*. Штаммы, несущие мутацию по этому гену, не способны к репарации ДНК.

Фотореактивации подвергаются только циклобутановые димеры. Надо отметить, что это пока почти единственная известная ферментная реакция, в

которой фактором активации служит не химическая энергия, а энергия видимого света. Дезокси-рибозидпиримидинфототиаза широко распространена у разных органических форм и представлена даже у таких примитивных микроорганизмов, как микоплазмы. Она есть у всех изученных бактерий, кроме *Micrococcus radiodurans*, которые чрезвычайно устойчивы к действию УФ-лучей и выдерживают дозы в 1000 раз более высокие, чем те, что летальны для *E.coli*. Фототиаза обнаружена в клетках многих растений. По-видимому, наибольшее значение фотореактивация имеет именно у растений.

**Фотодинамическая терапия.** Псоралены (фурокумарины) – соединения растительного происхождения. Они фотохимически активны и в комбинации с длинноволновым ультрафиолетом (320–400 нм) используются для лечения многих кожных и аутоиммунных заболеваний. Установлено, что фотохимиотерапия воздействует на иммунную систему, а ее молекулярной основой являются индуцируемые псораленами и светом реакции окислительной модификации мембран клеток, а также присоединение псораленов к клеточной ДНК.

**История ПУФА-терапии.** Существует кожное заболевание витилиго (лейкодермия), заключающееся в том, что в некоторых участках кожи деградируют и исчезают меланоциты – клетки, вырабатывающие пигмент меланин. Эти участки кожи никогда не пигментируются под действием солнечного света, они имеют белый цвет, что особенно заметно у людей со смуглой или черной кожей. Это заболевание неопасно для окружающих, хотя некоторые народы Востока принимали витилиго за проказу, в результате чего больные витилиго часто становились изгоями.

Примерно 4 тыс. лет назад в Египте и Индии для лечения витилиго начали использовать экстракты, получаемые при кипячении семян растений семейства зонтичных *Ammi majus* L. или бобовых *Psoralea coryli-folia* L. (индийская священная книга «Атарва Вега»). Экстракты либо наносили на поверхность кожи, либо принимали внутрь, после чего больные подвергались действию яркого в этих странах солнечного света. Лечение приводило к постепенному восстановлению пигментации. Без света экстракты не действовали, поскольку они содержали фотосенсибилизаторы, неактивные сами по себе. Дозировку света и содержавшегося в экстрактах фотосенсибилизатора в то время не могли контролировать. При заниженных дозах фотосенсибилизатора и освещения снижался терапевтический эффект, а при их передозировке возникали ожоги (эритема). Таким образом, уже древние египтяне и индусы практически применяли фотохимиотерапию.

Существенный прогресс был достигнут благодаря исследованиям египетского дерматолога Эль Мофти, который в 1947 году установил, что терапевтический эффект лекарственных растений обусловлен присутствием в их экстрактах молекул 8-метоксипсоралена (8-МОП). Это соединение поглощает в УФ-А-области спектра и является фотосенсибилизатором. Использование очищенного 8-МОП позволило создать стандартный фармацевтический препарат, при этом для облучения кожи по-прежнему использовали солнечный свет.

Следующий важный шаг был сделан в 1974 году благодаря сотрудничеству инженеров фирмы *Sylvania* (США) и дерматологов Гарвардского университета. Был разработан интенсивный источник УФ-А-излучения, позволивший контролировать режим облучения больных и избегать передозировок, приводящих к эритеме или более сильным ожогам кожи. С того времени и берет начало ПУФА-терапия в ее современном варианте. Интерес к ПУФА-терапии резко возрос, когда было обнаружено, что она эффективна не только при витилиго, но и при лечении чрезвычайно широко распространенного дерматоза – псориаза, которым болеют 3–5% населения планеты. При псориазе ускоряется деление базальных клеток эпидермиса, в результате чего на коже возникают утолщения – псориазные бляшки. Пораженные участки кожи зудят, чешутся. При обширном процессе больные становятся нетрудоспособными. ПУФА-терапия оказалась эффективной также при лечении гнездной плешивости, нейродермита, кожной Т-клеточной лимфомы, ревматоидного артрита и некоторых других заболеваний.

Псоралены содержатся во многих растениях, используемых в пищу. К ним относятся петрушка, пастернак, сельдерей (семейство зонтичных *Umbelliferae*), бергамот, апельсины, грейпфрут (семейство рутовых *Rutaceae*), инжир (семейство *Moraceae*), а также много других видов растений. Интенсивность ближнего ультрафиолета высока даже в наших северных широтах, кроме того, он проникает через белую одежду и, достигая кожи, запускает фотохимические реакции псораленов. Поэтому люди, сами того не подозревая, часто подвергаются малым дозам псораленовой фотохимиотерапии. Иногда это воздействие оказывается столь значительным, что вызывает световые ожоги кожи. Случаи сильного ожога кожи рук известны у сельскохозяйственных рабочих, собирающих в солнечную погоду урожай псораленсодержащих растений.

Высокая перспективность ПУФА-терапии повысила интерес исследователей к выяснению молекулярных механизмов фотохимических реакций псораленов. Было выяснено, что при действии света псоралены способны модифицировать биологические молекулы двумя способами: в результате кислороднезависимых реакций фотоприсоединения к ненасыщенным органическим молекулам и за счет окислительных фотореакций. Судя по числу публикаций, первому способу уделяется примерно в тысячу раз больше внимания, чем второму.

**Механизм фотохимических реакций.** Фотоприсоединение псораленов к нуклеиновым кислотам. Псоралены плохо растворимы в воде, поэтому при попадании в клетку они связываются преимущественно с гидрофобными структурами. Плоские молекулы псораленов содержат три кольца и напоминают по структуре пару комплементарных оснований ДНК. Такая пространственная организация псораленов способствует их связыванию с двуспиральной ДНК. При этом молекулы псораленов встраиваются (интеркалируют) между двумя парами оснований ДНК. Интеркаляция не ведет к серьезным последствиям для молекулы ДНК или клетки. Она

является обратимым процессом, и со временем при снижении в клетке концентрации псоралена он покидает молекулы ДНК. В 1965 году итальянские исследователи Л. Мюсайо, Дж. Родигьеро и Ф. Далл'Акуа обнаружили, что ситуация меняется, если комплекс ДНК – псорален подвергнуть УФ-А-облучению. При длинах волн более 320 нм ДНК в отличие от псораленов свет не поглощает. Псорален, напротив, поглотив квант света, переходит в электронно-возбужденное состояние. Возбужденная молекула псоралена ковалентно присоединяется к тимину ДНК, если он оказался рядом. У тимина в реакции участвует его единственная двойная связь в положении 5,6. У псоралена есть две возможности. Вблизи с 5,6-связью тимина оказывается либо 3,4-, либо 4',5'-двойная связь псоралена, по ним и осуществляется реакция фотоприсоединения. Соответственно после поглощения фотона между псораленом и тимином образуется 3,4- либо 4',5'-аддукт циклобутанового типа. Эти аддукты очень прочны (они выдерживают даже кипячение в кислоте или щелочи, тогда как связи между другими атомами разрываются). 3,4-аддукты не способны поглощать УФ-А-излучение и в дальнейших фотохимических реакциях участвовать не могут. Напротив, 4',5'-аддукты способны поглощать УФ-А-свет. Если такой аддукт поглотит квант света, а поблизости от 3,4-связи в двойной спирали ДНК окажется тимин, произойдет еще одна реакция фотоприсоединения с возникновением 3,4,4',5'-диаддукта. Диаддукт ковалентно связывает комплементарные нити ДНК.

Возникновение моно- и диаддуктов влечет за собой важные биологические последствия для клеток и является главной причиной летальных и мутагенных эффектов у бактерий и вирусов. Аддукты псоралены с ДНК могут удаляться репарирующими системами клеток, поэтому ПУФА-воздействие стало для молекулярных биологов удобным инструментом для изучения процессов репарации повреждений ДНК у вирусов, бактерий и других клеток.

Способность псораленов к фотоиндуцированному взаимодействию с ДНК высокоспецифична. Этой реакции длительное время приписывали роль единственного молекулярного механизма как лечебного, так и всех побочных эффектов при ПУФА-терапии дерматозов. Однако еще раньше Л. Киттлер обнаружил, что псоралены образуют циклобутановые аддукты не только с ДНК, но и с ненасыщенными липидами биологических мембран.

*Фотоокислительные реакции псораленов.* Фотоокислительные реакции псораленов изучали сравнительно мало. Вначале складывалось впечатление, что они не очень существенны или даже совсем неважны в биологии и медицине. Два соображения выдвигались против участия окислительных реакций в ПУФА-терапии. Во-первых, псоралены оказались относительно слабыми сенситизаторами фотоокисления по сравнению, например, с порфиринами или другими известными красителями. Во-вторых, механизмы сенситизированного фотоокисления для многих красителей очень похожи. Если бы псоралены вступали в фотореакции по этим механизмам, то их фотобиологические эффекты были бы сходны с эффектами других

красителей. Но это не так, многие дерматозы лечатся только ПУФА-терапией, тогда как другие красители совершенно неэффективны.

Способность псораленов фотосенсибилизировать окисление биомолекул было обнаружено в начале 60-х годов Д. Юдисом в США и Р. Али и С. Агарвала в Индии на примере одного из катехоламинов – диоксифенилаланина ([рис. 7.26](#)). Этот катехоламин крайне нестабилен и окисляется чрезвычайно легко при многих воздействиях. В. Поппе и Л. Гроссвайнер в 1975 году показали сенсибилизированное псораленами фотоокисление и инактивацию фермента лизоцима. Для осуществления этой реакции требовались гораздо более высокие дозы облучения, чем для кислороднезависимого фотоприсоединения псораленов к ДНК. К. Йошикава, Н. Мицуно и другие в 1979 году показали фотоокислительное присоединение псораленов к бычьему сывороточному альбумину. В том же году было обнаружено фотосенсибилизированное псораленами окисление ненасыщенных липидов. Эти наблюдения хотя и показали принципиальную способность псораленов сенсибилизировать фотоокисление, но не привлекли к ним достаточного внимания.

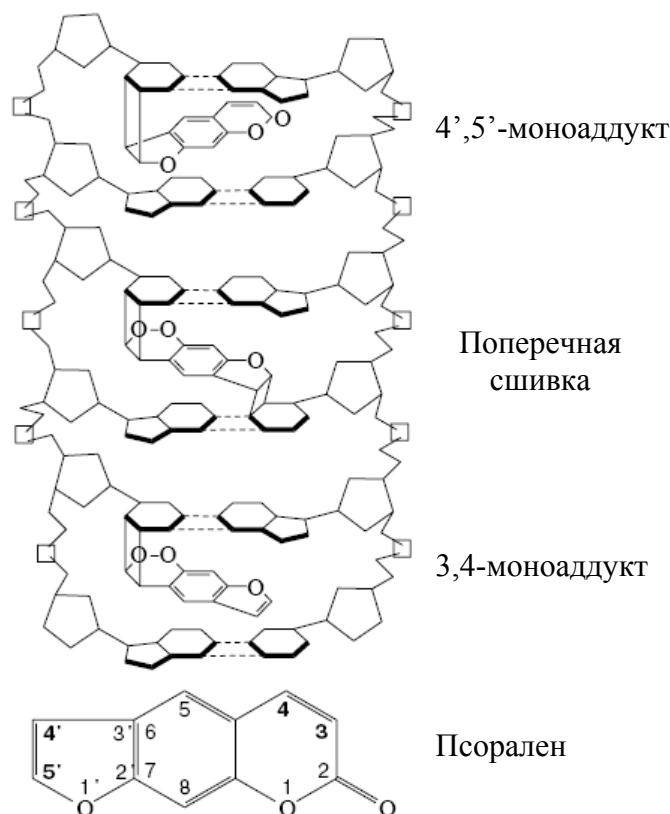


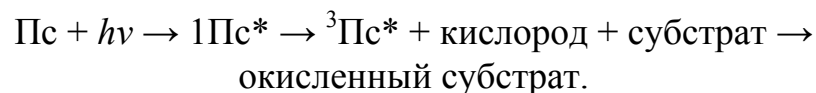
Рис. 7.26. Структура молекулы псоралена и продуктов его фотоприсоединения к двуспиральной ДНК

Ситуация начала изменяться после того, как красноярскими учеными в 1980 году было обнаружено, что антиоксиданты – витамин Е и ионол – ингибируют ПУФА-эритему, не влияя на фотоприсоединение псораленов к



ДНК. Это было первым прямым указанием на важную роль фотоокислительных реакций псораленов в коже человека. Возникла гипотеза, согласно которой фотоприсоединение псораленов к ДНК лежит в основе терапии, а фотоокислительные реакции приводят к побочным эффектам – эритеме. Возник вопрос о механизме реакций фотоокисления.

Для других красителей было известно, что в фотоокислении участвуют только триплетные<sup>1</sup> электронно-возбужденные состояния, имеющие во много тысяч раз большее время жизни, чем синглетные состояния. Псоралены (Pc), как и другие красители, поглотив квант света, переходят в синглетное возбужденное состояние ( $1Pc^*$ ), затем небольшая доля возбужденных молекул  $1Pc^*$  способна перейти в триплетное состояние ( $^3Pc^*$ ), хотя квантовый выход этого процесса обычно мал и не превышает нескольких процентов. Затем молекулы псоралена в триплетном состоянии при участии кислорода окисляют субстрат:



Вопрос заключался в том, как они это делают. Ранее были известны два типа фотоокислительных реакций красителей. В реакциях I типа происходит перенос электрона между возбужденным сенсibilизатором и субстратом, завершающийся окислением последнего; в реакции участвуют свободные радикалы сенсibilизатора. При II типе реакций происходит перенос энергии с триплетного красителя на молекулярный кислород с образованием электронно-возбужденного синглетного кислорода ( $^1O_2$ ,  $^1D_g$ ), с субстратом взаимодействует  $^1O_2$ . В реакциях типа II сенсibilизатор сам химически не изменяется, т. е. выполняет функцию катализатора реакции ([рис. 7.27](#)).

Оба типа реакций могут осуществляться только в том случае, если субстрат облучается в присутствии сенсibilизатора. Дело в том, что такие фотопродукты сенсibilизаторов, как свободные радикалы или синглетный кислород, обладают малым временем жизни ( $t$ ) и исчезают за милли- или микросекунды после выключения света. Таким образом, если добавить субстрат к сенсibilизатору после выключения света, никакой реакции с субстратом не произойдет. Псоралены способны обеспечивать оба типа реакций и не уникальны в этом отношении среди других красителей. Однако они способны и к фотохимическим реакциям типа III, к которым относят кислороднезависимые реакции фотоприсоединения псораленов к ДНК и ненасыщенным липидам.



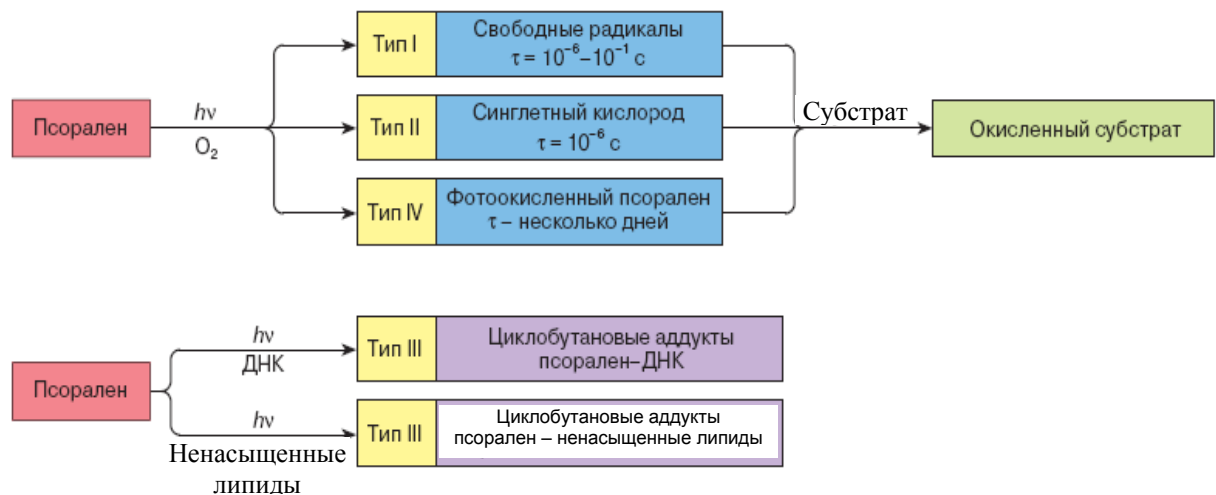


Рис. 7.27. Четыре типа фотореакций псораленов

В начале 60-х годов индийские ученые Р. Али и С. Агарвала обнаружили необычные долгоживущие фотопродукты псоралена. Они провели простой и изящный опыт, позволивший им сделать важные выводы. Исследователи приготовили картофельный сок, который при хранении довольно быстро темнел из-за присутствия в нем фермента тирозиназы, нарабатывавшего пигмент меланин. Темнел сок и при добавлении к нему необлученного псоралена. Если же пробирку с раствором псоралена держали при солнечном освещении, что приводило к его фотоокислению, а потом добавляли к картофельному соку, то картофельный сок не темнел. Ученые заключили, что предварительно фотоокисленный псорален ингибировал тирозиназу. Таким образом, был обнаружен новый тип фотоокислительных реакций псораленов, осуществляющийся с участием долгоживущих фотопродуктов сенситизатора. Эти продукты были относительно стабильны при отсутствии субстрата, но при столкновении с молекулами субстрата быстро с ним реагировали. Подобные реакции можно классифицировать как реакции IV типа.

При фотоокислении псоралена образуется смесь биологически активных продуктов, способных инициировать многие химические реакции и биологические процессы. Обнаружено, что ФОП повреждает ряд биологически важных молекул, например, он окисляет диоксифенилаланин в пигмент дофахром, инициирует перекисное окисление ненасыщенных липидов в суспензии липосом. ФОП увеличивает проницаемость мембран эритроцитов и фагоцитов. Введение ФОП в суспензию эритроцитов приводило к их гемолизу, а в случае иммунокомпетентных клеток фагоцитов резко усиливало их способность к фагоцитозу. Так как фагоциты являются начальным звеном иммунного ответа на действие различных антигенов, то

можно было ожидать, что при введении животным и человеку ФОП будет влиять на активность иммунной системы. Представлялось интересным выяснить, так ли это и может ли это свойство ФОП быть использовано в медицине.

### 7.6.2. Пути усовершенствования фотохимиотерапии

**Фотоферез.** Важным стимулом к продолжению исследований послужило открытие, сделанное в Йельском университете Р. Эдельсоном и соавторами. Они занимались ПУФА-терапией кожной *T*-клеточной лимфомы. Это злокачественное заболевание, проявляющееся в быстром размножении одной из разновидностей *T*-лимфоцитов, *T*-хелперов. *T*-лимфоциты склонны скапливаться под эпидермисом; в циркулирующей крови их концентрация у больных лимфомой также существенно повышена по сравнению с нормой. Первоначальная логика экспериментов была простой: если *T*-хелперов в крови слишком много, следует уменьшить их количество. Так как ПУФА-воздействие при достаточно высоких дозах способно повреждать геном и вызывать гибель клеток, авторы решили облучать лейкоциты в присутствии псораленов. Для этого у больных брали кровь и, чтобы уменьшить поглощение УФ-А-излучения гемоглобином, отделяли белые клетки крови от эритроцитов (лейкоферез). Затем облучали лейкоциты в присутствии псораленов (лейкоциты при этом погибали).

В США существуют строгие ограничения на эксперименты на людях. Но разрешение для этих опытов было получено, так как больные находились на последней, неизлечимой стадии заболевания. Для того чтобы проверить, не будет ли ПУФА-повреждение лейкоцитов токсичным для больных, было решено ввести им облученную кровь обратно в кровеносное русло. Каковы же были удивление и радость исследователей, когда они увидели, что состояние безнадежных больных значительно улучшилось, а у некоторых из них признаки заболевания исчезли полностью. Таким образом, был открыт новый метод псораленовой фотохимиотерапии, названный фотоферезом. Оказалось, что фотоферез эффективнее, чем ПУФА-терапия не только при кожной *T*-клеточной лимфоме, но и при других заболеваниях: псориазе, ревматоидном артрите и даже СПИДе. Спектр заболеваний, вылечиваемых фотоферезом, оказался широким. Новый метод терапии эффективен при заболеваниях с патологическими изменениями в *T*-клеточном звене иммунитета. В настоящее время фотоферез находит все более широкое применение в клинике. Серьезным ограничением для этого метода является его невероятно высокая цена. Для излечения больных кожной *T*-клеточной лимфомой требуется 8–10 сеансов фотофереза при стоимости каждого сеанса 12 тыс. долларов США. Это существенно дороже, чем ПУФА-терапия.

Открытие фотофереза привело к значительному прогрессу в понимании механизма псораленовой фотохимиотерапии. Дело в том, что при ПУФА-

терапии дерматозов воздействие оказывалось непосредственно на поверхность кожи. Это создавало иллюзию локального характера действия псораленов и света на аномально быстро делящиеся в коже клетки. До открытия фотофереза считалось, что при кожной *T*-клеточной лимфоме псоралены вступают в фотохимические реакции непосредственно с локализованными под эпидермисом злокачественно размножающимися клетками (*T*-хелперами), а псориаз лечится за счет того, что образование сшивок псорален – ДНК приводит к торможению деления клеток в псориазных бляшках. При фотоферезе облучались только лейкоциты, тогда как псориазные бляшки или кожные опухоли вообще не подвергались облучению, и в них не могли протекать фотохимические реакции псораленов. Тем не менее терапевтический эффект у больных наблюдался. Отсутствовало объяснение лечебного эффекта при заболеваниях, при которых скорость деления клеток понижена, – витилиго и гнездной плешивости. При этих заболеваниях псоралены не фотосенсибилизировали торможения деления клеток, а, наоборот, ускоряли эти процессы. Р. Эдельсон и его коллеги были вынуждены искать новое объяснение механизма псораленовой фотохимиотерапии. В многочисленных экспериментах на животных и людях они доказали, что фотореакции псораленов действуют на иммунную систему, в частности на *T*-клеточное звено иммунитета.

**Фотохимиотерапия в темноте.** Важнейшим показателем состояния *T*-клеточного звена иммунитета является так называемая реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), заключающаяся в следующем. Если в организм животных ввести какой-либо антиген, то происходит иммунологическая сенсибилизация и в зависимости от вида антигена за 4–7 дней нарабатывается клон *T*-клеток, способных специфически распознавать и уничтожать этот антиген. Если такому сенсибилизированному животному повторно ввести тот же антиген (тест-инъекция), то *T*-клетки его узнают, диффундируют к месту введения антигена и уничтожают его. Это сопровождается локальной воспалительной реакцией и отеком. Процесс диффузии занимает примерно одни сутки, отек также развивается не сразу, поэтому и вся реакция носит замедленный характер.

Р. Эдельсон с сотрудниками показали, что фотоферез приводит к подавлению (супрессии) реакции ГЗТ. Такой же эффект супрессии ГЗТ ранее был показан при воздействии многих лекарств, обладающих терапевтическим эффектом при псориазе, например: циклоспорина А, каменноугольной смолы, дитранола. Поэтому способность супрессировать ГЗТ стали связывать со способностью лечить псориаз, другие дерматозы, а также аутоиммунные заболевания.

Было решено проверить, способен ли ФОП влиять на реакцию ГЗТ (рис. 7.28). Для этого мышам вводили антиген – эритроциты барана (ЭБ), через три дня раствор предоблученного псоралена и еще через день повторно

эритроциты барана. На следующие сутки появлялся отек в месте введения антигена. Оказалось, что фотоокисленный псорален обладает свойствами иммуномодулятора, хотя механизм его действия оказывается сложнее, чем при фотоферезе или ПУФА-терапии. Если для последних была известна только супрессия реакции ГЗТ, то ФОП в зависимости от дозы облучения оказался способен не только подавлять, но и усиливать реакцию ГЗТ. Активирующее действие проявлялось при малых дозах предоблучения псоралена, а супрессия вызывалась большими дозами.

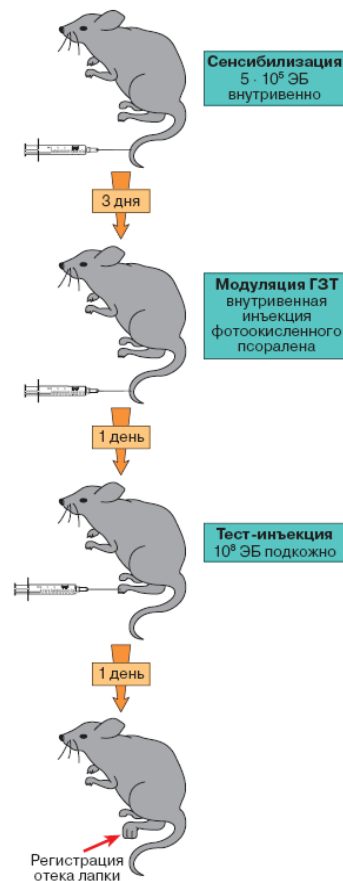


Рис. 7.28. Реакция гиперчувствительности замедленного типа у мышей

Подавление реакции гиперчувствительности замедленного типа указывало на то, что ФОП может обладать терапевтической активностью. Для проверки этого предположения мышам прививали *T*-клеточную лимфому *EL-4*. Эта опухоль у мышей является моделью кожной *T*-клеточной лимфомы человека. Введение мышам ФОП приводило к двух-трехкратному торможению роста опухолей. Ингибирующий эффект мало зависел от способа введения ФОП: его можно было вводить внутривенно, подкожно, поить мышей раствором ФОП или закапывать его в нос. Во всех этих случаях происходил запуск иммунного ответа и наблюдался терапевтический эффект.

Обнаруженные эффекты ФОП позволяют сформулировать следующие выводы. Во-первых, можно утверждать, что за терапевтические эффекты ответственны не только реакции фотоприсоединения псораленов к ДНК

(которые происходят без участия кислорода, см. реакции типа III на [рис. 7.27](#)); существенную роль играют также фотореакции псораленов с участием кислорода ([рис. 7.29](#)). Во-вторых, открылась возможность для создания «фотохимиотерапии в темноте». При такой терапии нет необходимости облучать кожу или кровь больных, достаточно в организм больного ввести предварительно фотоокисленные псоралены.

УФ-А-предоблученный псорален при низких дозах (1–3 мин) активировал, а при высоких дозах (10–30 мин) супрессировал реакцию ГЗТ к эритроцитам барана у мышей. *P* – положительный контроль: мышей sensibilizировали эритроцитами барана и тестировали без воздействия предоблученного псоралена. *N* – отрицательный контроль: проводили только тестирование без sensibilизации и предварительно облученного псоралена.

Таким образом, можно видеть, что в четырехтысячелетней истории развития псораленовой фотохимиотерапии наибольшие достижения получены за последние 30–35 лет. За это время выявлены основные первичные стадии фотохимических реакций псораленов. Показана важная медицинская роль их реакций с ДНК и мембранами клеток. Сделан вывод о том, что фотохимиотерапия является по своей сути иммунотерапией, другими словами, фотопродукты псораленов выполняют роль сигналов, включающих и выключающих звенья иммунной системы, восстанавливая нарушенный при заболеваниях порядок работы этих звеньев.

Можно считать установленным, что лечебный эффект псораленов достигается за счет УФ-А-облучения биосубстрата в присутствии sensibilизатора, как это происходит при ПУФА-терапии и фотоферезе. При этих разновидностях терапии осуществляются все четыре типа фотореакций, приведенных на [рис. 7.27](#). Любопытным представляется IV тип реакций с участием ФОП. ФОП-терапия может быть названа фотохимиотерапией в темноте, так как воздействию света подвергается sensibilизатор вне организма, а больной вообще не подвергается облучению. При этой терапии не протекают реакции типов I–III.

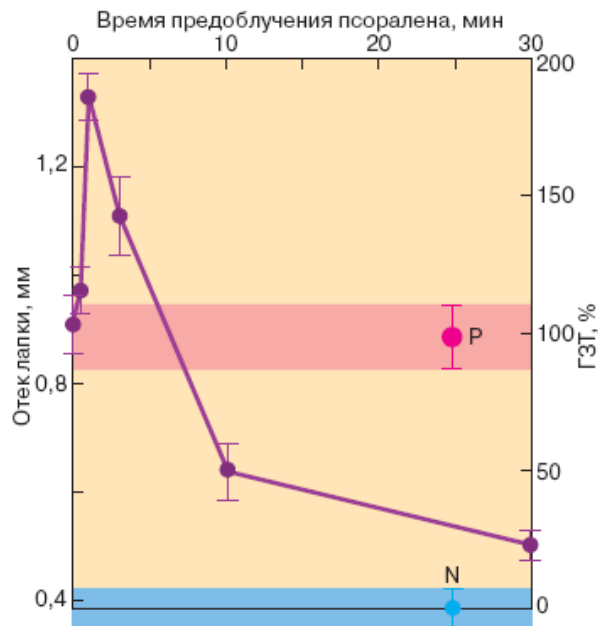


Рис. 7.29. Модуляция реакции гиперчувствительности замедленного типа фотоокисленным псораленом

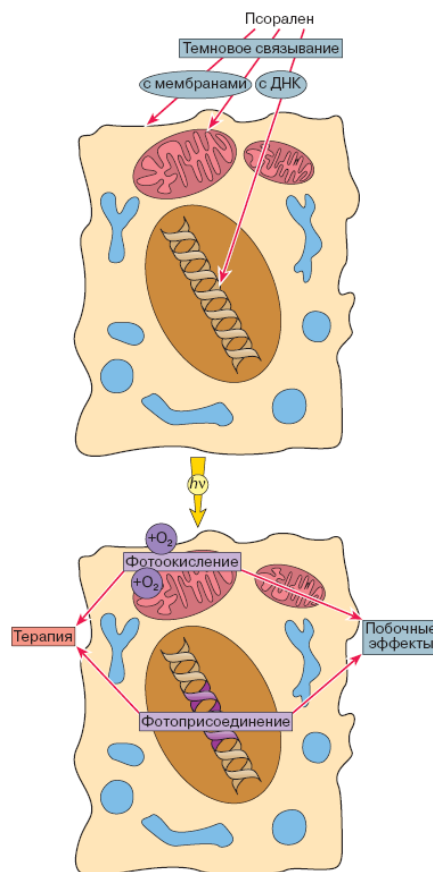


Рис. 7.30. Фотохимические реакции псоралена в клетке при фотохимиотерапии

Что же изменилось в псораленовой фотохимиотерапии в результате бурного развития науки? Вернемся на 4 тыс. лет назад, к начальному этапу



развития. Древние индийские и египетские врачи экстрагировали псоралены из семян растений. Естественно, что приготовление экстрактов и их хранение проводили на свету. В солнечном свете всегда содержится достаточно ближнего ультрафиолета, чтобы за несколько минут окислить псорален и накопить иммуномодуляторы. Таким образом, больные всегда получали ФОП-терапию. Затем на солнечном свету в коже больных осуществлялись все четыре типа фотореакций псораленов. Следовательно, еще в древности практически применялось сочетание ПУФА- и ФОП-терапии. После систематических усилий многих ученых и привлечения современных методов исследования и теоретических представлений молекулярной биологии, иммунологии и фотобиологии сложные механизмы фотохимиотерапии оказались раскрытыми. Сейчас становится понятным, на что направлены фотореакции псораленов, их терапевтическое воздействие теперь можно количественно дозировать и делать его адекватным для лечения конкретных заболеваний ([рис. 7.30](#)).

### **7.7. Перспективы исследования роли электронно-возбужденных состояний в жизнедеятельности живых организмов**

Подавляющее количество химических процессов в живых клетках протекает без образования и использования молекулярных электронно-возбужденных состояний. Тем не менее, хорошо известно, что в организме животных электронно-возбужденные состояния молекул часто возникают при перекисном окислении липидов. У ряда бактерий, животных и некоторых микроводорослей существуют специализированные ферментативные системы, в результате функционирования которых с высокой эффективностью излучается видимый свет.

С другой стороны, поглощая свет, растения используют образующиеся электронно-возбужденные молекулярные состояния для обеспечения энергетического метаболизма и ассимиляции углекислого газа. Химические процессы, связанные с предварительным поглощением света и образованием молекулярных электронно-возбужденных состояний, протекают также в органах зрения, при загаре, образовании витамина D, репарации ДНК и т. д.

Таким образом, в живых организмах электронно-возбужденные состояния возникают в результате метаболизма или действия солнечного света, однако эти процессы до настоящего времени рассматриваются независимо друг от друга. В фотобиофизике существует большое количество и других неясных проблем, которые активно изучаются.

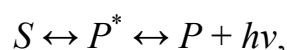
Это связано, прежде всего, с перспективами прикладных применений фундаментальных фотобиофизических исследований.

## 7.8. Основные проблемы и нерешенные задачи в фотобиофизике, возможные пути их прояснения

Химическая природа образующихся и использующихся в реакциях, протекающих в живых клетках электронно-возбужденных состояний очень разнообразна, часто в клетках для катализа данных реакций используются как простые, так и довольно сложные ферментативные системы. По этим причинам до настоящего времени не предложено общего физического механизма, описывающего протекание данных процессов в живых клетках. Чаще всего обсуждаются механизмы с разделением зарядов.

**Образование и реализация электронно-возбужденных молекулярных состояний в ферментативных реакциях. Единство хемилюминесцентных и фотохимических процессов.** Неясной проблемой является проблема разработки теории и механизма ферментативного катализа с участием электронно-возбужденных состояний (их наработка и реализация).

Прежде всего, необходимо отметить, что протекание хемилюминесцентных и фотосинтетических реакций описывается одним уравнением:



где  $S$  и  $P$  – химические вещества, участвующие в реакциях,  $P^*$  – вещество  $P$ , находящееся в электронно-возбужденном состоянии,  $h\nu$  – квант света.

В соответствии с принципом детального равновесия данная реакция при соответствующих условиях должна быть полностью обратимой и может протекать как в прямом направлении (в этом случае она называется хемилюминесцентной), так и в обратном (тогда она называется фотохимической или фотосинтетической).

Это позволяет утверждать, что возможно единое описание фотосинтетических и хемилюминесцентных процессов.

**Модели фотосинтеза без разделения зарядов.** В соответствии с господствующими в настоящее время взглядами, базирующимися на Z-схеме фотосинтеза, электроны из образующихся после поглощения квантов света электронно-возбужденных молекул в фотосистемах I и II переносятся на другие молекулы, образуя восстановленные переносчики, окисляющиеся в электронтранспортной цепи. Другими словами, постулируется необходимость разделения зарядов в первичных актах фотосинтеза. Однако схемы с разделением зарядов для получения кислорода из воды требуют не менее 4 квантов света. Имеющаяся альтернативная схема фотосинтеза не затрагивает механизма первичных актов фотосинтеза.

Таким образом, фотосинтез характеризуется довольно низким коэффициентом полезного действия. Возникает вопрос, возможно ли

существование более эффективных фотосинтетических систем, хотя бы искусственных. Часто утверждается, что существование таких систем запрещено фотохимическим законом Эйнштейна. Действительно, закон Эйнштейна запрещает существование систем с разделением заряда с квантовым выходом кислорода из воды менее 4. Однако если допустить прямое участие электронно-возбужденной молекулы в качестве реагента фотохимической реакции, можно показать, что без нарушения закона Эйнштейна возможно построить фотосинтетические системы, квантовый выход по кислороду менее 4.

Действительно, фотохимические реакции, в ходе которых образуются вещества с большим запасом энергии в сравнении исходной энергией реагентов, не редкость. Можно допустить, что в значительном ряде случаев после поглощения света электронно-возбужденные молекулы принимают непосредственное участие в реакции без передачи электрона другим молекулам и образуют продукты в основном состоянии. Достаточное условие для протекания таких реакций – образование промежуточных метаболитов реакции, обладающих каким-либо типом пространственной симметрии. Следовательно, протекание таких реакций можно рассматривать в рамках физики эффекта Яна-Теллера. В этих рамках протекание химической реакции может осуществляться без разделения заряда.

Ситуация усложняется, если допустить возможность протекания фотосинтетической реакции по ян-теллеровскому механизму при участии катализатора или фермента. Участие в реакции фермента сильно ограничивает возможные типы пространственной симметрии промежуточных метаболитов, поскольку силы, действующие со стороны фермента также должны обладать определенной симметрией, не нарушающей пространственную симметрию метаболитов. Это накладывает жесткие требования на пространственную структуру ферментов. Однако в случае планарной симметрии промежуточного метаболита требования к пространственной структуре фермента кажутся вполне ясными, и ее реализация не вызывает сомнений.

Экспериментального доказательства возможности создания фотосинтетических систем с повышенной эффективностью пока не существует. Тем не менее определенные соображения в пользу их реальности можно высказать.

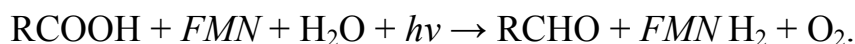
Возьмем, например, бактериальную биолюминесценцию. Бактериальная люцифераза является монооксигеназой и катализирует реакцию окисления длинноцепочечного алифатического альдегида при участии восстановленного флавинмононуклеотида:



где  $h\nu$  – квант света,  $\lambda$  – квантовый выход.

Обычно *in vitro* квантовый выход бактериальной биолюминесцентной реакции меньше 1, но, оптимизируя состав буферной системы, его можно значительно повысить и довести практически до 1.

Исходя из принципа детального равновесия, данная реакция, как и обычная химическая реакция, должна быть обратимой, если продукты реакции не удаляются из системы:



Основываясь на обратимости биолюминесцентных реакций, можно предположить, что определенные молекулы, находясь после поглощения кванта света в электронно-возбужденном состоянии, могут прямо участвовать в химических реакциях. В результате протекания подобных реакций должны образовываться высокоэнергетические вещества в основном электронном состоянии.

Таким образом, существование биолюминесцентных реакций, катализируемых специфическими ферментами, люциферазами, является определенным доводом в пользу экспериментального поиска природных фотосинтетических систем, функционирующих по ян-теллеровскому механизму, или их создания в лаборатории. Фундаментальных запретов, препятствующих их существованию, не имеется.

Простейшие схемы первичных фотохимических реакций, вытекающие из изложенного выше предположения и моделирующие функционирование фотосистемы II, приведены на [рис. 7.30](#).

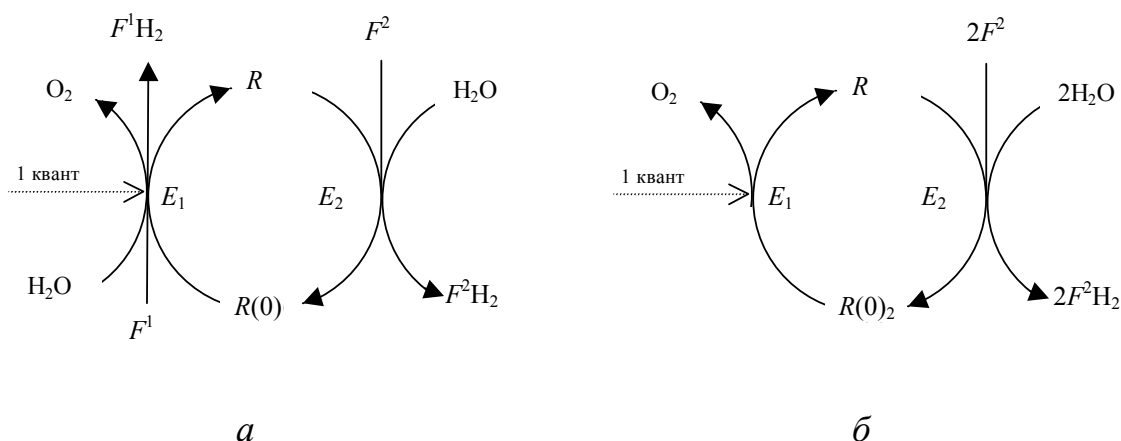


Рис. 7.31. Схемы одноквантовой модели фотосистемы II

На [рис. 7.31](#), а фермент  $E_1$  является светозависимой монооксигеназой, работающей в обратном направлении. Ее субстратом является молекула  $R(0)$  (или ее комплекс с коферментом  $F^1$ ), находящаяся после поглощения света в электронно-возбужденном состоянии. Фермент  $E_2$  является обычной дегидрогеназой.  $F^1$  и  $F^2$  – коферменты монооксигеназы и дегидрогеназы соответственно. Восстановленные формы этих коферментов окисляются в электрон-транспортной цепи, образуя *ATP* и *NAD PH*.

На [рис. 7.31](#), *б* фермент  $E_1$  является светозависимой диоксигеназой, также работающей в обратном направлении.

Аналогичные схемы можно представить и для фотосистемы I, заменяя кислород другим элементом, простым радикалом или даже достаточно сложной частью какой-либо органической молекулы.

Для модели, работающей в соответствии с этими схемами, необходим только 1 квант света на выделение 1 молекулы кислорода. Конечно, энергии квантов света и образующихся восстановленных коферментов должны быть согласованы, чтобы не было противоречия с законами термодинамики.

Возможны различные модификации данных схем и комбинации этих схем с классическими представлениями. Например, схема, приведенная на [рис. 7.32](#), для образования 1 молекулы кислорода требует два кванта света, а схема, приведенная на [рис. 7.33](#), – три кванта света. В этих случаях необходима дополнительная светозависимая ферментативная система для разложения воды. Эта система может работать и с разделением зарядов, и, в принципе, без разделения.

Классический вариант фотосинтеза в данных комбинациях является крайним вариантом, в котором образовавшаяся при поглощении кванта света электронно-возбужденная молекула не участвует сама в реакции, а передает электрон на другую молекулу, восстанавливая ее.

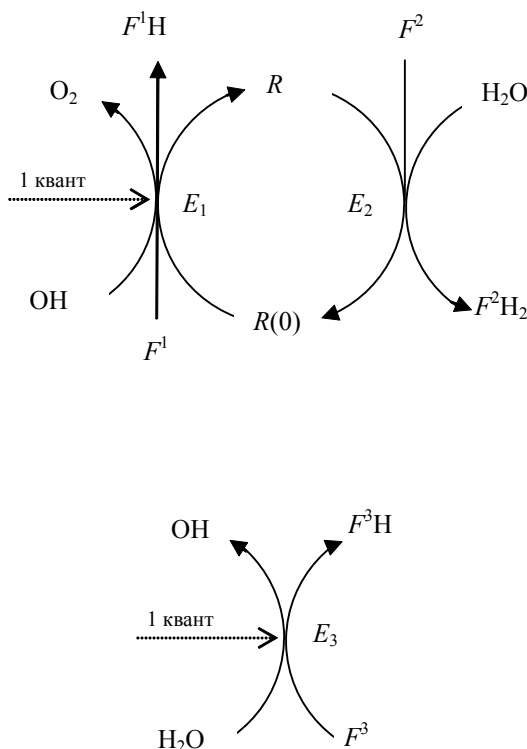


Рис. 7.32. Схема двухквантовой модели фотосистемы II

Таким образом, основываясь на механизме фотосинтетических реакций без разделения зарядов и классических схемах с разделением зарядов, можно предложить целый набор моделей фотосистемы II с затратой фотонов для выделения 1 молекулы кислорода от 1 до 4. Все сказанное можно

отнести и к моделям фотосистемы I, построенным по аналогичному принципу.

Конечно, здесь приведены сугубо формальные схемы и, естественно, возможность реализации механизмов без разделения зарядов в природных первичных фотосинтетических процессах должна проверяться экспериментально. С этой точки зрения, возможно, следовало бы обратить внимание на виолоксантиновый цикл. Но даже если окажется, что предлагаемый механизм без разделения зарядов в природных системах не реализуется, можно было бы попытаться реализовать его в искусственных системах.

Существенным подтверждением высказываемого предположения могло бы служить экспериментальное доказательство возможности протекания биолюминесцентных реакций в обратном направлении.

Таким образом, в рамках физики эффекта Яна-Теллера можно рассмотреть альтернативные механизмы хемолюминесцентных и фотосинтетических реакций, не требующие разделения зарядов.

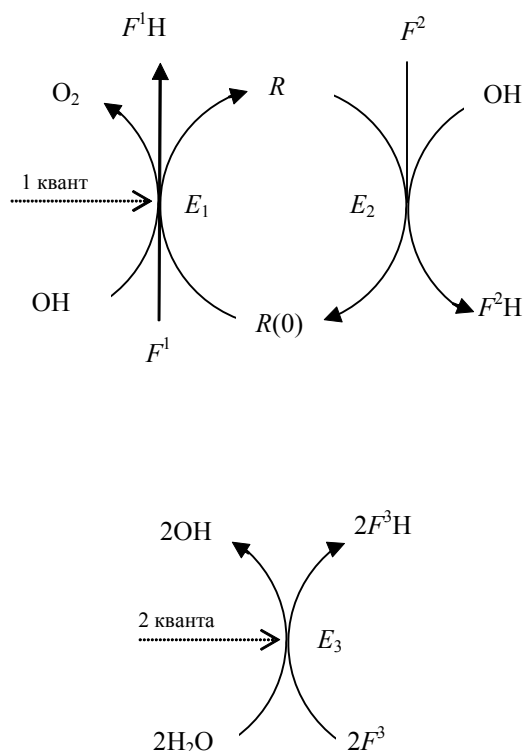


Рис. 7.33. Схема трехквантовой модели фотосистемы II

Ян-теллеровский механизм связан с образованием промежуточного метаболита реакции, имеющего высокую степень пространственной симметрии. Участие в реакции фермента ограничивает возможные типы



пространственной симметрии промежуточных метаболитов. В этом случае наиболее вероятна плоскостная симметрия промежуточных метаболитов.

**Возникновение и эволюция фотосинтетических систем.** Проблема возникновения фотосинтетического аппарата до сих пор не прояснена. Понять происхождение фотосинтеза так же трудно, как понять возникновение живой клетки.

Прежде всего необходимо отметить, что свет должен был играть исключительную роль в возникновении и существовании первичного геохимического цикла, без которого вообще невозможно объяснить возникновение живых клеток и биосферы в целом. Концепция происхождения жизни и биосферы на основе геохимического цикла приведена ниже, на [рис. 7.34](#).



Рис. 7.34. Общая схема эволюционирующей пребиотической фазово-обособленной автокаталитической системы

В результате разработки теории возникновения и реализации электронно-возбужденных молекулярных состояний появится возможность создания искусственных люцифераз для аналитических целей. Особенна важна данная теория для разработки высокоэффективных методов получения

водорода из воды, поскольку будущее за водородной энергетикой. Возможно создание еще целого ряда приборов и методов, в том числе для фототерапии.

Таким образом, фотобиофизика является научным разделом, в котором тесно сплетены биологические, химические и физические подходы. Особый упор приходится делать на физическое осмысливание разнообразных биологических и химических явлений.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Таблица П1.1

Длина волны, волновые числа и энергия фотона

$\lambda$ , нм	$\nu$ , см <sup>-1</sup>	$E$		$\lambda$ , нм	$\nu$ , см <sup>-1</sup>	$E$	
		кДж/моль	эВ			кДж/моль	эВ
100	100000	1196	12,40	500	20000	239	2,48
200	50000	595	6,20	550	18181	218	2,25
250	40000	481	4,96	600	16667	200	2,07
300	33333	398	4,13	700	14285	171	1,77
350	28571	343	3,54	800	12500	149	1,55
400	25000	299	3,10	900	11111	133	1,38
450	22222	266	2,76	10000	10000	120	1,24

Таблица П1.2

Соотношение между различными единицами

Физическая величина, единицы измерения	$\nu$ , см <sup>-1</sup>	кДж/моль	эВ	$\lambda$ , нм
$\nu$ , см <sup>-1</sup>	1	$1,1962 \cdot 10^{-2}$	$1,2398 \cdot 10^{-4}$	$10^7/\nu$
$E$ , кДж/моль	83,598	1	$1,0364 \cdot 10^{-2}$	$1,1962 \cdot 10^5/E$
$E$ , эВ	8065,8	96,48	1	$1239,8/E$
$\lambda$ , нм	$10^7/\lambda$	$1,1962 \cdot 10^5/\lambda$	$1239,8/\lambda$	1

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2

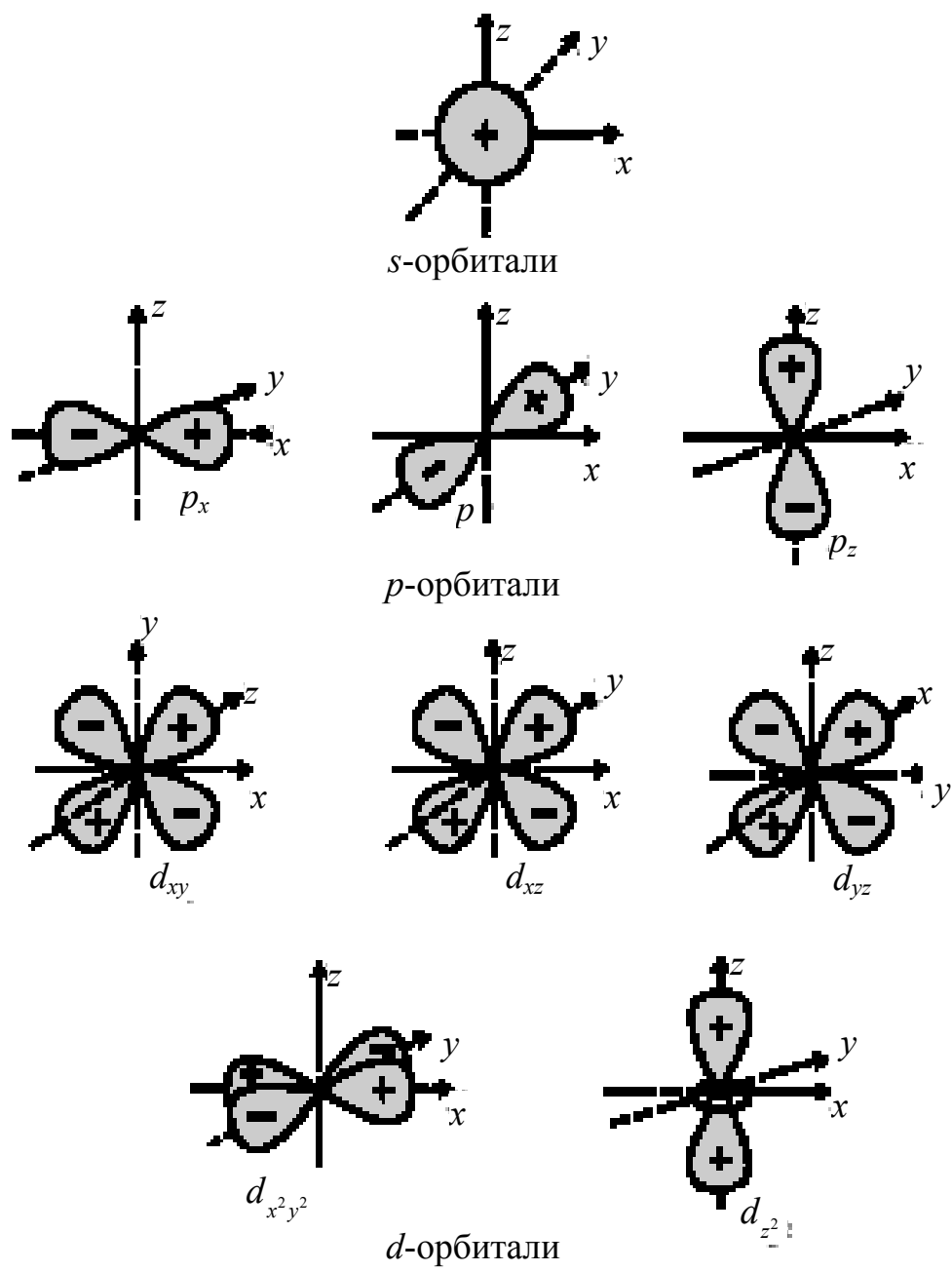


Рис. П2.1. Пространственное расположение волновых функций электрона

## ПРИЛОЖЕНИЕ 3

### Система квантовых характеристик электрона

**Главное квантовое число.** Главное квантовое число  $n$  определяет энергию электрона и может принимать любые целочисленные значения: 1, 2, 3 ... Энергию электрона в атоме водорода можно определить из уравнения

$$E = -\frac{e^2}{2r_b} \frac{1}{n^2} = -13,6 \frac{1}{n^2},$$

где  $e$  – заряд электрона;  $r_b$  – боровский радиус, равный 0,53 А.

Графически энергию квантовых состояний электронов в атоме водорода можно изобразить при помощи уровней энергии. На рис. ПЗ.1 горизонтальные линии соответствуют значениям энергии электрона в атоме водорода. Энергия связи электрона с ядром оценивается количеством энергии, необходимой для его удаления от ядра на бесконечное расстояние. Поэтому значения энергии электрона указываются со знаком минус. На ближайшем к ядру энергетическом уровне энергия электрона минимальна.

Излучение или поглощение энергии происходит при изменении квантового состояния электронного облака, т. е. при изменении его энергии.

**Орбитальное квантовое число.** Энергетические уровни обычно представляют собой совокупность подуровней. Это связано с тем, что энергия электрона зависит не только от расстояния от ядра, но и от момента количества движения ( $mvr$ ). Этот орбитальный момент количества движения электрона также подчиняется законам квантования, т. е. принимает не любые, а только вполне определенные значения. Величина орбитального момента количества движения электрона определяется квантовым числом  $l$  (орбитальное квантовое число), которое может принимать целочисленные значения от 0 до  $(n-1)$ . Каждому значению  $l$  соответствует определенная форма орбитали. Квантовые подуровни с различными величинами  $l$  ( $l = 0, 1, 2, 3 \dots$ ) чаще всего обозначают буквами (соответственно  $s$ -,  $p$ -,  $d$ -,  $f$ -подуровни), а электроны, находящиеся в этих состояниях,  $s$ -,  $p$ -,  $d$ -,  $f$ -электронами. Решения уравнения Шредингера показывают, что  $s$ -электроны ( $l = 0$ ) имеют орбитали в форме шара,  $p$ -электроны ( $l = 1$ ) – форму гантели,  $d$ -электроны – форму розетки или сложной гантели.

Согласно законам квантовой механики момент импульса квантуется по правилу

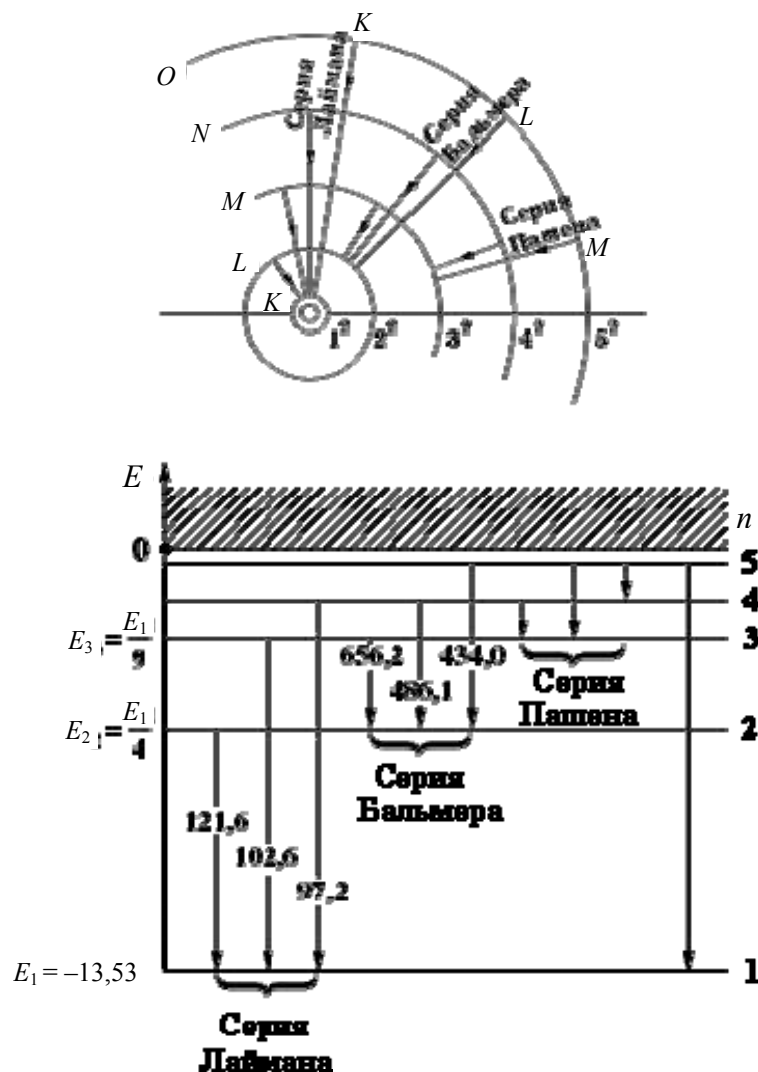


Рис. П3.1. Схема уровней энергии и квантовые переходы электрона в атоме водорода

*Магнитное квантовое число  $m$ .* Если поместить атом в магнитное поле, то в зависимости от расположения орбитали по отношению к внешнему магнитному полю энергия орбиталей с одинаковым орбитальным числом  $l$  будет различна. Эта энергия, определяемая взаимодействием внешнего магнитного поля и собственного магнитного поля, которое возникает при движении электрона по орбитали, также изменяется скачками. Вследствие этого орбитали располагаются в пространстве определенным образом. Так,  $p$ -орбитали располагаются перпендикулярно друг другу по осям декартовых координат. В соответствии с направлением их обозначают –  $p_x, p_y, p_z$ .

Магнитное число  $m$  определяет ориентацию орбитального момента в пространстве. Согласно законам квантовой механики величина проекции момента на некоторое направление  $z$  принимает дискретные значения:

$$L_{iz} = \hbar m ,$$



где  $m$  – магнитное квантовое число, которое при заданном  $l$  может принимать значения

$$m = 0, \pm 1, \pm 2, \dots, \pm l.$$

Таким образом, вектор момента импульса электрона в атоме может иметь в пространстве  $2l+1$  возможных ориентаций.

*Спиновое квантовое число.* Электрон вращается вокруг собственной оси (по часовой стрелке или против нее). Вращательному движению, как и всякому другому виду движения, соответствует момент движения. Спиновый магнитный момент квантуется и может принимать значения  $+1/2(h/2\pi)$  и  $-1/2(h/2\pi)$ , а спиновое квантовое число  $s$  – значения  $1/2$  и  $-1/2$ .

## ПРИЛОЖЕНИЕ 4

### Физико-химические и спектральные характеристики цветных флуоресцирующих белков\*

Объект (источник)	Явление/условия	Поглощение (возбуждение флуоресценции)		Излучение		Молекулярный вес мономерной единицы белка, кДа
		$\lambda_{\text{макс}}^{\text{нм}}$	коэффициент экстинкции, $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{макс}}^{\text{нм}}$	квантовый выход	
1	2	3	4	5	6	7
Медуза <i>Aequorea victoria</i>	Зеленая биолюминесценция в разбавленном растворе KCl или при облучении УФ					
Акворин (из <i>A. victoria</i> )	Синяя биолюминесценция в присутствии ионов $\text{Ca}^{2+}$			460		21,631*
GFP — зеленый флуоресцирующий белок (из <i>A. victoria</i> )	Зеленая флуоресценция	395–397 (pH 8) 475 (pH 12)	27600, 25000 14000, 11000	508–509 503	0,8	27 (26,884 <sup>н</sup> )
GFP — зеленый флуоресцирующий белок (из морского окурца <i>Renilla reniformis</i> )	То же	498 (pH 8) 470 (плечо)	133000**	508	0,8	27
S65T мутант GFP из <i>A. victoria</i>	То же	489 (pH 8) 394 (pH 4)	52000–58000	509–511 —***	0,64	26,898*
EGFP — улучшенный зеленый флуоресцирующий белок (производное GFP, содержащее мутацию S65T/F64L)	Зеленая флуоресценция. Улучшенная по сравнению с GFP эффективность сворачивания при более высокой температуре	488	55000–57000	507–509	0,60	26,864*
YFP — желтые флуоресцирующие белки (производные GFP, содержащие мутацию T203Y)	Желтоватая флуоресценция (более длинноволновая по сравнению с GFP)	404 510	—	524 527	—	26,946*
EYFP — улучшенные желтые флуоресцирующие белки (производные GFP, содержащие мутацию T203Y и дополнительные мутации, например, S65G/V68L/S72A/T203Y)	Желтоватая флуоресценция. Более подходящие физико-химические характеристики по сравнению с YFP	514 392	83400	527–528 —****	0,61	26,914*
CFP — циановые флуоресцирующие белки (производные GFP, содержащие мутацию Y66W)	Сине-зеленая флуоресценция	436	—	476–485	—	26,907*
BFP — синие флуоресцирующие белки (производные GFP, содержащие мутацию Y66H)	Синяя флуоресценция	383–385	21000	442–450	0,24	26,858*
zFP506 (из кораллов рода <i>Zoanthus</i> )	Зеленая флуоресценция	496	35600	506	0,63	26,109*
zFP538 (из кораллов рода <i>Zoanthus</i> )	Желтая флуоресценция	528	20200	538	0,42	26,160*
amFP486 (из кораллов <i>Anemonia majano</i> )	Сине-зеленая флуоресценция	453, 458	40000	486	0,24	25,363*
dsFP483 (из кораллов <i>Discosoma striata</i> )	То же	443	23900	483	0,46	25,687*
cFP484 (из кораллов рода <i>Clavularia</i> )	То же	456	35300	484	0,48	30,447*
drFP583 (из красных кораллов рода <i>Discosoma</i> )	Красная флуоресценция, медленно развивающаяся из зеленой	558 335 277 487	22500 75000	583 583 500 500	0,23 0,7	25,843* 28
K83R мутант drFP583	Зеленая флуоресценция	480		499		25,871*
E57 (V105A/I161T/S197A мутант drFP583)	Более яркая красная флуоресценция, более быстрое и полное созревание белка в клетках <i>E. coli</i> по сравнению с нативным drFP583	558	—	583	—	25,787*
E57-NA (R2A/K5E/K9T мутант E57)	Аналогичные E57 спектральные свойства, меньшая склонность к агрегации по сравнению с drFP583 и E57	558	—	583	—	25,676*

\* Приведена молекулярная масса, вычисленная на основании аминокислотной последовательности белка.

\*\* Приведен коэффициент экстинкции для мономера, коэффициент экстинкции димерной формы, облигатной для белка, 266000.

\* Источник: Зубова, Н. Н. Спектральные и физико-химические свойства зеленого (GFP) и красного (drFP583) флуоресцирующих белков / Н. Н. Зубова, А. Ю. Булавина, А. П. Савицкий // Успехи биологической химии. — Т. 43. — 2003. — С. 163–224.



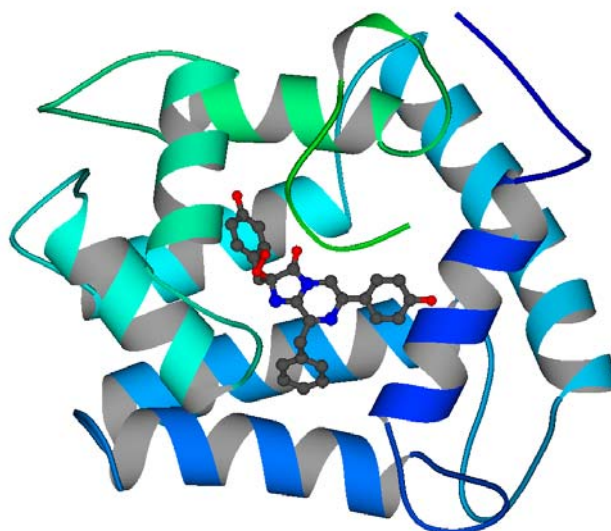
## ПРИЛОЖЕНИЕ 5



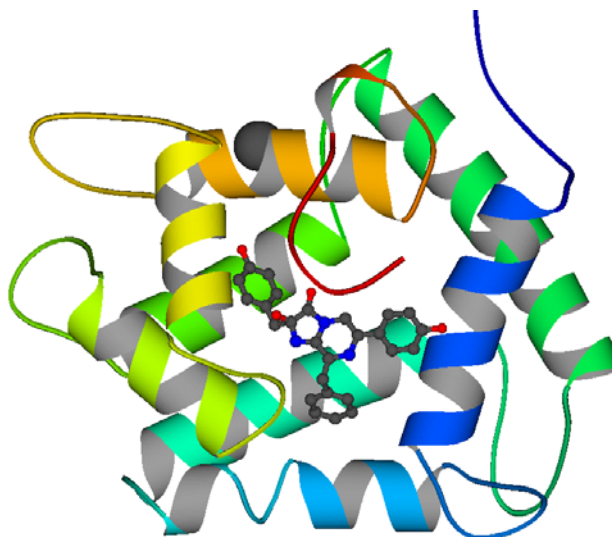
Рис. П5.1. Пространственная трехмерная структура люциферазы светляка *Photinus pyralis*\*

---

\* Источник: Conti E., Francis N. P., Brick P., Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate – forming enzymes, Structure, 1996, v. 4, p. 287–289.



*a*



*б*

Рис. П5.2. Пространственная трехмерная структура фотопротеинов акворина (*a*) и обелина (*б*)<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup> Источники: *a* – Head et al., 2000, *Nature* 405, 372; *б* – Liu et al., 2000, *Protein Sci.*, 9, 2085.

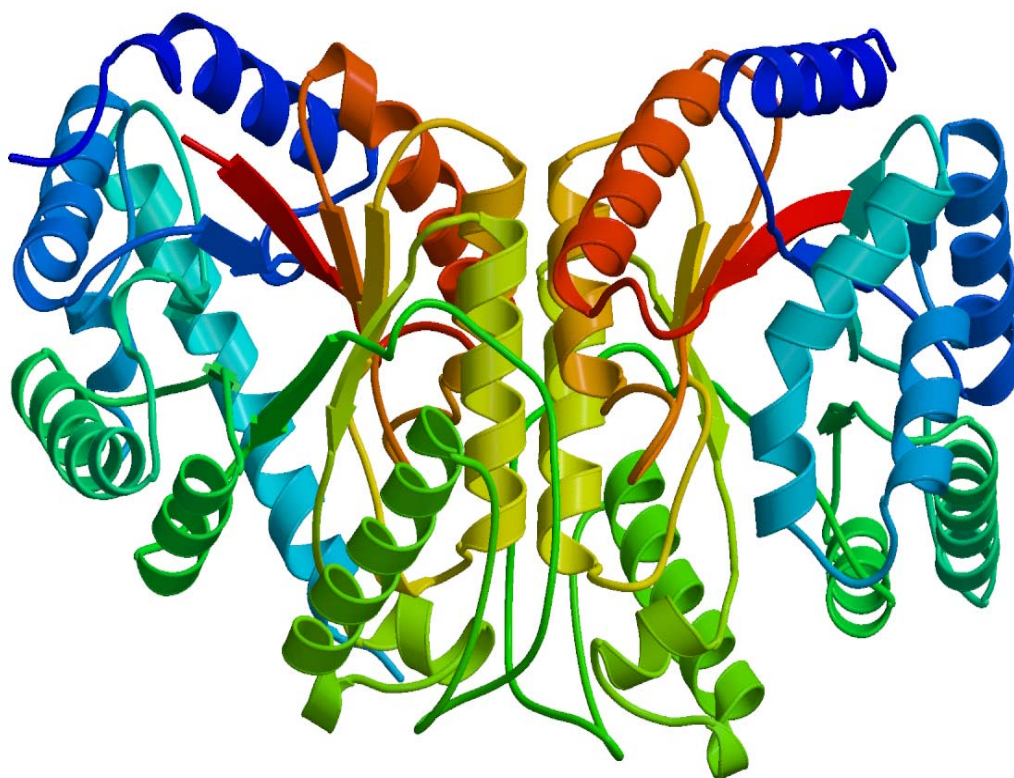


Рис. П5.3. Пространственная трехмерная структура люциферазы бактерий *Vibrio harveyi*

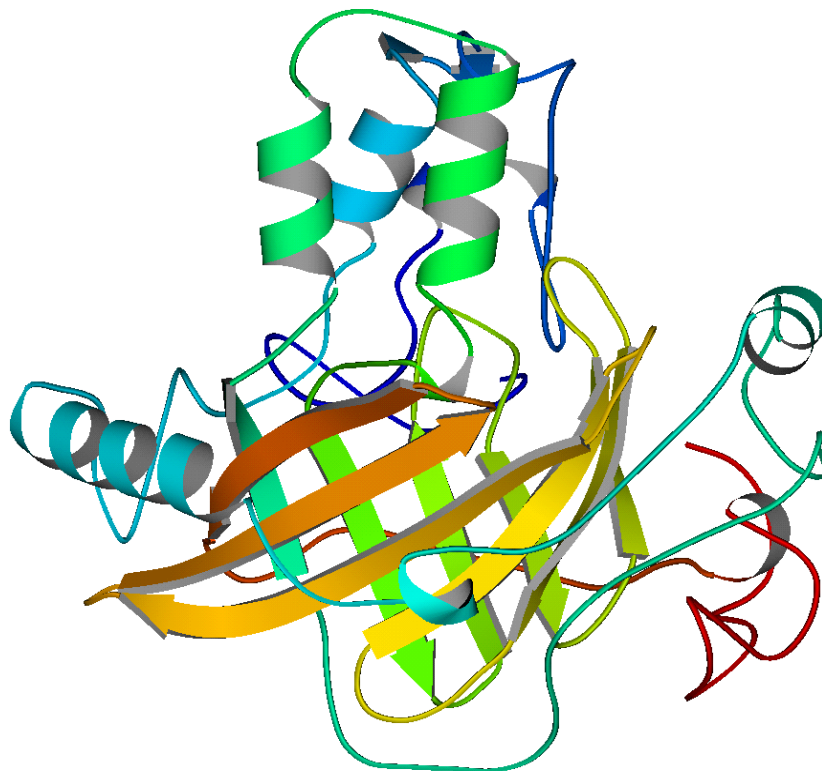


Рис. П5.4. Пространственная трехмерная структура люциферазы динофлагеллят *Lingulodinium Polyedra*

## ПРИЛОЖЕНИЕ 6

### Бактериальные биолюминесцентные биотесты

Биотест	Действующие вещества
Загрязнение пищевых продуктов микотоксинами, (7,53–31,79 – мкг/мл)	Рубратоксин В, зеараленон, пенициллин, патулин, цитринин, охратоксин А, РР-токсин, афлатоксин В1
Присутствие в среде антибиотиков (0,2 мкг/мл)	Тетрациклин, хлорамфеникол, стрептомицин, неомицин, гентамицин, канамицин
Токсичность сточных вод и водной среды	Ароматические углеводороды, дыхательные яды, фенольные соединения и продукты их деструкции, сульфатный лигнин, окрашенные фракции стоков, фенолоксидазы, детергенты, пестициды, тяжелые металлы, кобальт, отходы производства стабилизаторов
Токсичность в воздушной среде (компоненты ракетного топлива)	Диметилгидразин, альдегиды, спирты, ацетон, HCN, SO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> S, Cl <sub>2</sub> , продукты облучения смеси NO <sub>2</sub> и цис-2-бутена
Загрязнение среды гербицидами	Монурон, диурон, нефурон, атразин
Определение бактерицидной активности в сыворотке человека	Иммуноглобулины, комплементы
Модельное изучение влияния химических и физических факторов	Температура, давление, лекарственные препараты, анестетики (галотан), глицерин, сахара
Тест на мутагенность	—
Продукты окисления керогена сланцев	Высокомолекулярные кислоты
Токсичность для рыб	Органические вещества



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- NAD H* – никотинамид-адениндинуклеотид восстановленный  
*NAD<sup>+</sup>* – окисленная форма *NAD H*  
*FMN* – флавинмононуклеотид  
*FAD* – флавинадениндинуклеотид  
*tRNA<sup>Phe</sup>* – фенилаланинспецифичная транспортная РНК  
*DNS-Cl* – дансилхлорид, 1-диметиламинонафталин-5-сульфонилхлорид  
*BODIPY* – торговая марка серии специфических красителей, основу структуры которых составляет необычный флуорофор, содержащий атом бора  
*ANS* – 1-анилино-8-нафталинсульфоная кислота  
*TNS* – 2-*n*-толуидинилнафталин-6-сульфоная кислота  
*DPH* – 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен  
*TMA-DPH* – триметиламмониевая соль *DPH*  
*Fluorescein-PE* – флуоресцеин-фосфатидилхолин  
*Pyrenyl-PC* – и пиренил-фосфатидилэтаноламин  
*EtBr* – этидиум бромид  
*DAPI* – 4,6-диамидино-2-фенилиндол  
*MQAE* – *N*(метоксикарбонилфенил)-6-метоксихинолиний  
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
*7-UmP* – 7-умбелиферрил фосфат  
 $\epsilon$ -*ATP* – 1,*N*<sup>6</sup>-этенoadенозин-5'-трифосфат  
*CCVJ* – 9-(2-карбокси-2-циановинил)-юлолидин  
*GFP* – зеленый флуоресцентный белок  
*zFP538* – желтый флуоресцентный белок, выделенный из кораллов рода *Zoanthus*, аналог *GFP*  
*DsRed* – красный флуоресцентный белок, выделенный из кораллов рода *Discosoma*, аналог *GFP*  
*RET* – *resonance energy transfer* – резонансный перенос энергии  
*FRET* – *fluorescence resonance energy transfer* – флуоресцентный резонансный перенос энергии

## ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

*Абсолютный показатель преломления* равен отношению скорости света в вакууме  $c$  к скорости распространения излучения в данной среде  $v$ .

*Автофлуоресценция* – собственная (фоновая) флуоресценция биологического объекта.

*Акворин* – фотопротеин, выделенный из гидромедуз рода *Aequorea*.

*Аномальная дисперсия* – резкое изменение показателя преломления в узком диапазоне длин волн.

*Антиоксиданты* – вещества, реагирующие со свободными радикалами и тем самым тормозящие цепное окисление липидов, одновременно подавляющие хемилюминесценцию.

*Биолюминесцентные реакции* – ферментативные реакции с выделением света, происходящие в живых организмах.

*Биолюминесценция in vitro* – свечение биолюминесцентной реакции.

*Биохемилюминесценция* – сверхслабые свечения, биолюминесценция, т. е. определенные биохимические реакции сопровождаются появлением электронно-возбужденного продукта с последующим испусканием кванта света (люминесценции).

*Бозоны* – частицы с нулевым или целочисленным спином (например фотоны), описываемые симметричными волновыми функциями, подчиняющиеся статистике Бозе – Эйнштейна.

*Внеклеточная (экзогенная) биолюминесценция* – выделение организмом светящейся жидкости или слизи.

*Внутренняя конверсия* – быстрая релаксация на самый нижний колебательный уровень состояния  $S_1$ .

*Внутриклеточная (эндогенная) биолюминесценция* – излучение света собственными клетками организма.

*Вращательные уровни молекул* связаны с вращательным движением молекулы как целого.

*Время жизни возбужденного состояния* – это средний период времени, в течение которого флуорофор находится в возбужденном состоянии.

*Гетеродимер* – димер, состоящий из двух неидентичных субъединиц.

*Гетеролитическая фотодиссоциация* – реакция фотодиссоциации, приводящая к образованию ионов.

*Главное квантовое число  $n$*  – число, определяющее энергию электрона и принимающее любые целочисленные значения: 1, 2, 3 ...

*Гомолитическая фотодиссоциация* – реакция фотодиссоциации, приводящая к образованию радикалов и атомов.

*Действие ультрафиолетовых лучей* – бактерицидное или бактериостатическое действие на микроорганизмы, мутагенное действие, канцерогенное действие, образование витамина D из провитаминов, эритемное действие на кожу, образование загара, терапевтические эффекты.

*Деструктивно-модифицирующие реакции* – происходящее под действием света повреждение биологических молекул, приводящее к химическим реакциям, не свойственным организму в норме.

*Динамическое тушение* – процесс, уменьшающий интенсивность флуоресценции данного вещества, при этом тушитель должен диффундировать к флуорофору в течение времени нахождения в возбужденном состоянии.

*Дисперсия* – изменение показателя преломления при изменении длины волны (частоты).

*Доза излучения  $D$*  – энергетическая экспозиция, количество облучения, экспозиционная доза, равная произведению интенсивности на длительность облучения.

*Закон Бера* – коэффициент поглощения пропорционален концентрации в случае слабых растворов при непоглощающем растворителе.

*Зрение* – превращение световой энергии в энергию нервного импульса в сетчатке глаза или в аналогичных фоторецепторах.

*Интенсивность излучения ( $I$ )* – модуль среднего по времени значения плотности потока энергии.

*Интеркомбинационная конверсия* – переход из возбужденного синглетного состояния  $S_1$  в триплетное  $T_1$ .

*Интермедиат* – промежуточный фермент-субстратный комплекс.

*Искусственный флуорофор* – это внесенная в биологический объект флуоресцирующая молекула.

*Истинный спектр возбуждения флуоресценции* – график зависимости  $\epsilon$  от длины волны или частоты возбуждающего света.

*Квантовый выход биолюминесценции* – отношение числа испущенных фотонов к количеству прореагировавших молекул люциферина.

*Квантовый выход образования продукта фотохимической реакции* – отношение количества образовавшегося продукта  $\Delta N$  к количеству света, поглощенного исходным веществом  $\Delta I_a$ .

*Квантовый выход флуоресценции* – отношение числа испущенных в процессе флуоресценции квантов к числу поглощенных.

*Колебательные уровни молекул* соответствуют энергии колебательных движений ядер и молекул около некоторых равновесных положений.

*Конечный биологический эффект* – результат биохимических или структурных изменений, проявляющийся на уровне организма: происходит синтез богатых энергией веществ, движение биообъекта, модификация генотипа и т. п.

*Корпускулярно-волновой дуализм* – двойственный характер представлений о природе света: с одной стороны, свет представляет собой поток частиц – фотонов (корпускул), с другой – свет является электромагнитной волной.

*Коферменты* – низкомолекулярные соединения, необходимые некоторым ферментам для проявления их каталитической активности.

*Коэффициент пропускания* – отношение интенсивности прошедшего через тело светового потока к интенсивности потока, падающего на него.

*Коэффициент экстинкции* – коэффициент, характеризующий способность вещества поглощать свет, приведенный к единице концентрации вещества.

*Линейчатые спектры* – спектры, состоящие из небольшого числа линий.

*Люминесценция* (от латинского *lumen* – свет и *-escent* – суффикс, означающий слабое действие) – свечение вещества, представляющее собой избыточное излучение по сравнению с тепловым излучением тела, продолжающееся в течение времени, значительно превышающего период световых колебаний.

*Люминофор* – это атом или группа атомов, которые являются единицей в процессе испускания света: типичными органическими хромофорами и люминофорами являются C=C-, C=O- и ароматические группы.

*Люцифераза* – фермент, катализирующий биолюминесцентную реакцию.

*Люциферин* – низкомолекулярное соединение, испытывающее окисление в ходе биолюминесцентной реакции; субстрат люциферазы.

*Магнитное число  $m$*  – число, определяющее ориентацию орбитального момента в пространстве.

*Миграция энергии* – безызлучательный обмен энергией между электронно-возбужденной молекулой (донором) и молекулой в основном состоянии (акцептором).

*Молярный коэффициент поглощения* – коэффициент, равный оптической плотности 1 М раствора, измеренной при толщине кюветы  $l = 1$  см.

*Неспецифическое (общее) влияние растворителя* – влияние, зависящее от показателя преломления и диэлектрической постоянной растворителя.

*Нормальная дисперсия* – линейная зависимость показателя преломления от длины волны.

*Обелин* – фотопротеин, выделенный из гидроидных полипов рода *Obelia*.

*Огибающая Франка – Кондона* имеет форму полосы поглощения, которая определяется принципом Франка – Кондона.

*Оптическая область спектра* – ультрафиолетовое, видимое и инфракрасное излучение.

*Оптическая плотность* – логарифм величины, обратной коэффициенту пропускания.

*Орбитальное число  $l$*  – число, определяющее орбитальный момент импульса электрона.

*Отбор по перекрыванию* – правила отбора по перекрыванию связаны с различными пространственными свойствами орбиталей, затрагиваемых в процессе электронного перехода.

*Отбор по симметрии* – отбор, в процессе которого электронный переход из основного состояния является разрешенным по симметрии тогда, когда свойства симметрии произведения волновых функций основного и возбужденного состояний  $\Psi_G \Psi_A$  совпадают хотя бы одного из операторов дипольного момента перехода.

*Пигменты* – хромофоры живых организмов, поглощающие в видимом диапазоне.

*Плотность потока энергии ( $J$ )* – поток энергии через единичную площадку, расположенную перпендикулярно к направлению, в котором переносится энергия.  $J$  – вектор Умова – Пойтинга, который, как известно из курса общей физики, можно найти как произведение плотности энергии ( $\omega$ ) на скорость волны ( $v$ ).

*Поглощение света* – это изменение интенсивности света, обусловленное превращением энергии электромагнитного поля волны в другие виды энергии (чаще всего в энергию хаотического теплового движения атомов и молекул вещества), если не происходят фотохимические реакции и вещество достаточно однородно, так что можно пренебречь рассеянием.

*Полосатые спектры* – спектры сложных молекул, для которых число спектральных линий велико, они сливаются, образуя отдельные полосы.

*Поперечное сечение поглощения, или эффективное сечение*, – сечение площади  $s$  (см<sup>2</sup>), при попадании в которое происходит поглощение фотона.

*Поток излучения  $\Phi$*  (Вт или Эйнштейн/с) равен энергии, переносимой через некоторую поверхность  $S$  за единицу времени  $t$ .

*Правило Хунда* – в пределах подуровня электроны заполняют максимальное количество орбиталей.

*Принцип запрета Паули* – любые два фермиона не могут одновременно находиться в одном и том же состоянии.

*Принцип Франка – Кондона* состоит в том, что электронные переходы являются настолько быстрыми ( $10^{-14}$ – $10^{-15}$  с) по сравнению с движением ядер в молекуле ( $10^{-12}$ – $10^{-13}$  с), что за время электронного перехода относительное расположение ядер и их кинетическая энергия практически не изменяются.

*Природный (естественный) флуорофор* – это флуоресцирующая молекула, содержащаяся в биологическом объекте.

*Реабсорбция* – испускание кванта света одной молекулой и поглощение этого кванта другой молекулой, если донор и акцептор энергии – молекулы одного вида.

*Сила осциллятора* – величина, которая характеризует вероятность электронных переходов в результате захвата квантов света данным хромофором.

*Скорость фотохимического процесса* – скорость, определяемая величиной квантового выхода и интенсивностью поглощаемого системой света.



*Спектр действия* – зависимость относительной эффективности изучаемого явления от длины волны возбуждающего света.

*Спектр испускания флуоресценции* – это зависимость интенсивности флуоресценции от длин волн (в нанометрах) или волновых чисел (в  $\text{см}^{-1}$ ).

*Специфическое влияние растворителя* – влияние, обусловленное специфическими химическими взаимодействиями между флуорофором и молекулами растворителя (в частности образованием водородных связей и комплексов).

*Спиновый отбор* – электронные переходы между состояниями различной мультиплетности запрещены.

*Сплошные спектры* – спектры сложных молекул, для которых полосы в спектре очень широки.

*Стабильный продукт* – стабильное соединение, которое отличается устойчивостью в течение достаточно длительных промежутков времени.

*Статическое тушение* – процесс, который уменьшает интенсивность флуоресценции данного вещества, при котором между флуорофором и тушителем образуется комплекс, который не флуоресцирует.

*Сцинтиллоны* – светоизлучающие органоиды динофлагеллят.

*Тривиальная абсорбция (trivial absorption)* – испускание кванта света одной молекулой и поглощение этого кванта другой молекулой.

*Триpletное состояние* – состояние молекулы, содержащей два электрона с параллельными спинами.

*Триpletный уровень* – энергетический уровень электрона с обращенным спином.

*Топотаксис* – движение объекта к источнику света (положительный) или от него (отрицательный).

*Тропифототаксис* – ориентация объектов вдоль или поперек луча (эффект поворота).

*Тушение флуоресценции* – любые процессы, которые уменьшают интенсивность флуоресценции данного вещества.

*Фермионы* – частицы с полуцелым спином (электроны, протоны, нейтроны), описываются антисимметричными волновыми функциями, подчиняются статистике Ферми – Дирака.

*Флуоресцентная метка* – искусственный флуорофор, связанный с молекулой-объектом исследования ковалентными связями.

*Флуоресцентный зонд* – искусственный флуорофор, связанный с молекулой-объектом исследования нековалентными связями.

*Флуоресценция* – излучательный переход между состояниями одинаковой мультиплетности.

*Флуорофор* – это флуоресцирующая молекула.

*Фоботаксис* – перемещение объектов, связанное не с направлением светового луча, а с освещенностью поля.

*Фосфоресценция* – излучательный переход между состояниями разной мультиплетности.



*Фотобиологические процессы* – фотосинтез, фототаксис, фототропизм, зрение, биохеомлюминесценция и др.

*Фотобиологические реакции* – реакции, возникающие в биологических системах различной сложности под действием света.

*Фотобиофизика* – раздел биофизики, изучающий фотобиологические процессы, протекающие в организмах под действием видимого, ультрафиолетового и ближнего инфракрасного излучения.

*Фотокинез* – увеличение или уменьшение под действием света подвижности биологических объектов (соответственно положительный и отрицательный кинезы), не сопровождающееся направленным движением по отношению к источнику света.

*Фотоморфогенез* – регуляторное влияние света на рост и развитие растений и микроорганизмов, не зависящее от направленности светового луча.

*Фотоперегруппировки* – фотореакции, в ходе которых один изомер или таутомер превращается в другой.

*Фотопродукт* – продукт фотореакции, непосредственно участвующий в дальнейших химических или физико-химических превращениях.

*Фотопротеин* – устойчивый комплекс люциферазы с люциферинном и кислородом.

*Фотоселекция* – при возбуждении поляризованным светом селективно возбуждаются те молекулы флуорофора, для которых дипольный момент перехода при поглощении параллелен электрическому вектору возбуждающего света.

*Фотосинтез* – синтез органических молекул за счет энергии солнечного света.

*Фотостериоизомеризация* – частный случай реакции изомеризации, если в ходе реакции перегруппировываются отдельные атомы или группы в молекуле.

*Фототаксис* – фотоиндуцированные направленные движения свободных биологических объектов.

*Фототаутомеризация* – внутримолекулярное перемещение протона под действием света, наблюдаемое для многих ароматических соединений.

*Фототропизм* – индуцированное светом движение части фиксированного биологического объекта (поворот листьев или стеблей растений к свету или от света).

*Фотофизические процессы* – процессы взаимодействия света с веществом: фотовозбуждение, испускание, фотодиссоциация, фотоионизация, перенос энергии возбуждения от донора к акцептору, тушение и некоторые другие.

*Фотофоры* – специальные биолуминесцентные органы рыб, кальмаров и других организмов.

*Фотохимические реакции* – реакции, отличающиеся от просто химических тем, что происходят с молекулами в возбужденном состоянии (а не в основном).

*Фотоциты* – клетки многоклеточных организмов, в которых происходят биолюминесцентные реакции

*Функционально-физиологические реакции* – запускаемые с помощью света реакции, в которых образуются продукты, необходимые для выполнения естественных функций клеток или организмов

*Хемилюминесцентные реакции* – химические реакции, в которых происходит выделение энергии в виде квантов света

*Хемилюминесценция* – это процесс испускания света молекулами, возбужденными в ходе химической реакции.

*Химический квантовый выход* – отношение количества образовавшегося продукта к количеству прореагировавшего исходного соединения.

*Хромофор* – молекула, способная поглощать свет определенного диапазона длин волн.

*Хромофор* – это атом или группа атомов, которые являются единицей в процессе поглощения света.

*Целентеразин* – люциферин кишечнорастворимых и многих других светящихся организмов, гетероциклическое соединение, производное имидазолпиразина.

*Экциплексы* – комплексы, образующиеся в возбужденном состоянии.

*Электронные конфигурации* – совокупности атомных орбиталей различного пространственного строения.

*Электронные уровни энергии* – уровни энергии, связанные с расстоянием электронных орбиталей от ядер.

*Эмиттер* – молекула, при дезактивации которой происходит излучение света.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Абелев, Г. И. Основы иммунитета / Г. И. Абелев // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 5. – С. 4–10.
2. Баславская, С. С. Фотосинтез / С. С. Баславская. – М.: изд-во МГУ, 1974. – С. 154–156.
3. Берсукер, И. Б. Эффект Яна-Теллера и вибронные взаимодействия в современной химии / И. Б. Берсукер. – М.: Наука, 1988.
4. Биосфера. Эволюция, пространство, время / ред. Р. У. Симс, Дж. Прайс, П. Э. С. Уэлли. – М.: Прогресс, 1988. – 242 с.
5. Владимиров, В. Л. Фотохимия и люминесценция белков / В. Л. Владимиров. – М.: Наука, 1965. – С. 113–120, 140–144.
6. Владимиров, Ю. А. Сверхслабые свечения в биохимических реакциях / Ю. А. Владимиров. – М., 1966.
7. Владимиров, Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков. – М., 1972.
8. Владимиров, Ю. А. Физико-химические основы фотобиологических процессов / Ю. А. Владимиров, А. Я. Потапенко. – М.: Высш. шк., 1989.
9. Владимиров, Ю. А. Фотобиология и спектральные методы исследования / Ю. А. Владимиров, Ф. Ф. Литвин. – М.: Высш. шк., 1964.
10. Волотовский, И. Д. Фитохром – регуляторный фоторецептор растений / И. Д. Волотовский. – Минск, 1992.
11. Говинджи, Д. Фотосинтез: в 2 т. / Д. Говинджи, Дж. Уитмарш и др. – 1987.
12. Гринштейн, Б. Наглядная биохимия / Б. Гринштейн, А. Гринштейн. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2000. – 119 с.
13. Дижур, А. М. Новый специфичный для фоторецепторных клеток белок с молекулярной массой 26 кДа / А. М. Дижур, Э. Р. Некрасова, П. П. Филиппов // Биохимия. – 1991. – Т. 56. – С. 225–229.
14. Камшилов, М. М. Эволюция биосферы / М. М. Камшилов. – М.: Наука, 1979. – 256 с.
15. Клейтон, Р. Фотосинтез. Физические механизмы и химические модели / Р. Клейтон. – М.: Мир, 1984.
16. Климов, В. В. Фотосинтез и биосфера / В. В. Климов // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 8. – С. 6–13.
17. Конев, С. В. Фотобиология / С. В. Конев, И. Д. Волотовский. – Минск: изд-во БГУ, 1974.
18. Коренев, Ю. М. Общая и неорганическая химия. Ч. I. Основные понятия, строение атома, химическая связь / Ю. М. Коренев, В. П. Овчаренко. – М.: Изд-во МГУ, 2000.
19. Кудряшева, Н. С. Физико-химические основы биолюминесцентного анализа: учеб. пособие / Н. С. Кудряшова, В. А. Кратасюк, Е. Н. Есимбекова. – Красноярск: Краснояр. гос. ун-т., 2002. – 154 с.
20. Кузнецова, Г. А. Природные кумарины и фурукумарины /

Г. А. Кузнецова. – Л.: Наука, 1967. – 247 с.

21. Кукушкин, А. К. Лекции по биофизике фотосинтеза растений / А. К. Кукушкин, А. Н. Тихонов. – М.: МГУ, 1988.

22. Кулаева, О. Н. Как свет регулирует жизнь растений / О. Н. Кулаева // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Т. 7. – № 4. – С. 6–12.

23. Лакович, Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии / Дж. Лакович. – М.: Мир, 1986.

24. Ленинджер, А. Основы биохимии: в 3 т. / А. Ленинджер. – М.: Мир, 1985.

25. Мерзляк, П. Н. Пигменты, оптика листа и состояние растений / П. Н. Мерзляк // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 4. – С. 19–24.

26. Миронов, А. Ф. Фотодинамическая терапия рака – новый эффективный метод диагностики и лечения злокачественных опухолей / А. Ф. Миронов // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 8. – С. 32–40.

27. Молекулярные механизмы биологического действия оптического излучения. – М.: Наука, 1988.

28. Островский, М. А. Фоторецепторные клетки / М. А. Островский. – М.: Знание, 1978.

29. Общая биология / ред. В. К. Шумный. – М.: Просвещение.

30. Потапенко, А. Я. Исследование действия УФ-света на биологические мембраны. Изменение электропроводности бимолекулярных фосфолипидных мембран / А. Я. Потапенко, Д. И. Рощупкин, Е. А. Когон, Ю. А. Вламиров // Докл. АН СССР. – 1972. – С. 882.

31. Потапенко, А. Я. Действие света на человека и животных / А. Я. Потапенко // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 10. – С. 13–21.

32. Потапенко, А. Я. Применение антиоксидантов для исследования и оптимизации фотохимиотерапии / А. Я. Потапенко, А. А. Кягова // Биол. мембраны. – 1998. – Т. 15. – № 2. – С. 213–220.

33. Фотоокислительные реакции псораленов и их роль в терапии дерматозов / А. Я. Потапенко, Ю. С. Бутов, Е. С. Левинзон и др. // Вестн. Росс. акад. мед. наук. – 1999. – № 2. – С. 32–38.

34. Потапенко, А. Я. Псоралены и медицина 4000-летний опыт фотохимиотерапии / А. Я. Потапенко // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6. – № 11. – С. 22–29.

35. Рубин, А. Б. Биофизика: в 2 т. / А. Б. Рубин. – 1999.

36. Рубин, А. Б. Первичные процессы фотосинтеза / А. Б. Рубин // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 10. – С. 79–84.

37. Рубин, А. Б. Биофизические методы в экологическом мониторинге / А. Б. Рубин // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6. – № 4. – С. 7–13.

38. Рощупкин, Д. И. Действие ультрафиолетового излучения на мембранные структуры животных клеток / Д. И. Рощупкин, А. Б. Пеленицын,

В. В. Талицкий // Роль изменений структуры мембран в клеточной патологии: сб. ст. – М., 1977. – С. 53.

39. Саган, К. В. Происхождение предбиологических систем / К. В. Саган – М.: Мир, 1966.

40. Семенов, Н. Н. О некоторых проблемах химической кинетики и реакционной способности / Н. Н. Семенов. – М., 1958.

41. Сидоренко, В. М. Молекулярная спектроскопия биологических объектов: учеб. пособие для вузов / В. М. Сидоренко. – М.: Высш. шк., 2004.

42. Скулачев, В. П. Эволюция биологических механизмов запасаения энергии / В. П. Скулачев // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 5. – С. 11–19.

43. Тарусов, Б. К. Сверхслабое свечение биологических систем / Б. К. Тарусов, И. И. Иванов, Ю. М. Петрусевич. – М., 1969.

44. Тихонов, А. Н. Электронный парамагнитный резонанс в биологии / А. П. Тихонов // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 11. – С. 8–15.

45. Турро, Н. Молекулярная фотохимия / Н. Турро. – М.: Мир, 1967. – 328 с.

46. Физиология растений / Н. Д. Алехина, Ю. В. Балнокин, В. Ф. Гавриленко и др.; ред. И. П. Ермаков. – 2-е изд., исп. – М.: Издательский центр «Академия», 2007. – 640 с.

47. Филиппов, П. П. Биохимия зрительной рецепции / П. П. Филиппов, В. Ю. Аршавский, А. М. Дижур. – М.: ВИНТИ, 1987.

48. Филиппов, П. П. Как внешние сигналы передаются внутрь клетки / П. П. Филиппов // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 3. – С. 28–34.

49. Фрейдлин, И. С. Как читать иммунограмму / И. С. Фрейдлин // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 7. – С. 25–30.

50. Шарапова, Г. Я Псориаз. / Г. Я. Шарапова, Н. Г. Короткий, М. Н. Молоденков. – М.: Медицина, 1989.

51. Шигорин, Д. Н. Электронно-возбужденные состояния многоатомных молекул / Д. Н. Шигорин, Г. А. Валькова, Е. А. Гаспилович и др. – М.: Наука, 1993. – 495 с.

52. Шувалов, В. А. Первичное преобразование световой энергии при фотосинтезе / В. А. Шувалов. – М.: Наука, 1990.

53. Экологическая биофизика: научно-педагогическое издание: в 3 т. Т. 1. Фотобиофизика экосистем / общ. ред. И. И. Гительзон, Н. С. Печуркин. – М.: Логос, 2001. – 350 с.

54. Эммануэль, Н. М. Торможение процессов окисления жиров / Н. М. Эммануэль, Ю. П. Ляковская. – М., 1961.

55. Экспериментальные методы химической кинетики. Фотохимия: учеб. пособие / М. Я. Мельников, В. Л. Иванов. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 2004. – 125 с.

56. Bateman, U., Gee G. A kinetic investigation of the photochemical oxidation of certain non-conjugated alkenes / U. Bateman, G. Gee // Proc. Roy. Soc.



Ser. A, 1948. – P. 195–391.

57. Dizhoor, A. M., Recoverin: A Calcium Sensitive Activator of Retinal Rod Guanylate Cyclase / A.M. Dizhoor, S.Ray, S. Kumar et al. // Science, 1991. – Vol. 251. – P. 915–918.

58. Fesenko, E. E. Induction by Cyclic GMP of Cationic Conductance in Plasma Membrane of Retinal Rod Outer Segment / E.E. Fesenko, S.S. Kolesnikov, A.L. Lyubarsky // Nature (London). 1985. Vol. 313. – P. 310–313.

59. Garrett, R. H. Biochemistry / R. H. Garrett, C. M. Grisham. – 2nd Edition. – 1999.

60. Gasparro, F. P. Sunscreens, skin photobiology, and skin cancer: the need for UVA protection and evaluation of efficacy / F. P. Gasparro // Environ Health Perspect, 2000. – V. 108 (Suppl 1). – P. 71–78.

61. Gorodovikova, E. N. et al. Recoverin Mediates the Calcium Effect Upon Rhodopsin Phosphorylation and cGMP Hydrolysis in Bovine Retinal Rod Cells / E. N. Gorodovikova, et al. // FEBS Lett. – 1994. – Vol. 349. – P. 187–190.

62. Hellingwerf, K. J. Photobiology of Bacteria / K. J. Hellingwerf, W. Crielaard, W. D. Hoff, H. C. R. Matthijs, L. R. Mur, B. J. van Rotterdam // Antonie van Leeuwenhoek (Kluwer Academic Publishers), 1994. – V. 65. – P. 331–347.

63. Israel Ausín. Environmental regulation of flowering / Ausin Israel, Carlos Alonso-Blanco, José-Miguel Martínez-Zapate // Int. J. Dev. Biol., 2005. – V. 49. – P. 689–705.

64. Jorge, J. Regulation of gene expression by light / J. Jorge, Casal And Marcelo, J. Yanovsky // Int. J. Dev. Biol., 2005. – M. 49. – P. 501–511.

65. Kazuya Ogawa. Construction and photophysical properties self-assembled linear porphyrin arrays / Kazuya Ogawa, Yoshiaki Kobuke // Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews, 2006.– Vol. 7. – P. 1–16.

66. Koutalos, Y. Regulation of Sensitivity in Vertebrate Rod Photoreceptors by Calcium / Y. Koutalos, K.-W. Yau // TINS, 1996. – Vol. 19. – P. 73–81.

67. Lakowicz, Jr. Principles of fluorescence spectroscopy / Jr. Lakowicz. – Kluwer Academic Plenum Publishers: N.Y., 1999. – 495 p.

68. Lundberg, W. Peroxidation of polyunsaturated fatty compounds / W. Lundberg, Jörn P. // Prog. Chem. Fat. Lipids, 1968. – 9. – 379.

69. Parrish, J. A. Photochemo-therapy of Psoriasis with Oral Methoxsalen and Longwave Ultraviolet Light / J. A. Parrish, Fitzpatrick T. B., Tannenbaum L. et al. // New England J. Med., 1974. – Vol. 291. – P. 1207–1211.

70. Philippov, P. P. The Phosphodi-esterase Cascade of a Photoreceptor Cell: Mechanisms of Activation and Quenching / P. P. Philippov, V. Yu. Arshavsky, A. M. Dizhoor // Sov. Sci. Rev. Physicochem. and Biol., 1990. – Vol. 9. – P. 245–307.

71. Roderick, K Clayton. Photosynthesis. Physical mechanisms and chemical patterns / K Clayton. Roderick. – Cambridge University Press, Cambridge, 1980.

72. Stoeckenius, W. Bacterial rhodopsins: evolution of a mechanistic model for the ion pumps / W. Stoeckenius // Protein Sci., 1999. – V. 8. – P. 447–459.



73. Zozulya, S. Calcium-myristoyl Protein Switch / S. Zozulya, L. Stryer // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1992. – Vol. 89. – P. 115690–115737.
74. <http://nibiryukov.narod.ru>
75. <http://festival.1september.ru>
76. Noonan F.P., De Fabo E.C. // Photochemistry and Photo-biology. 1995. – V. 61. – P. 227.
77. Свободнорадикальные состояния и их роль при лучевом поражении и злокачественном росте: тезисы докл. – М., 1971.
78. Hill, R., Bendall F. Nature, 1960. – Vol. 186. – P. 136–137.
79. Arnon, D. Tang G.M.-S. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981. – Vol. 78. – № 5. – P. 2942–2946.
80. Roy J. Glauber. One hundred years of light quanta, Nobel Lecture, December 8, 2005.