

В. Б. ЕВСТИГНЕЕВ, В. А. ГАВРИЛОВА

## О РЕАКЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ ЭЛЕКТРОДНО-АКТИВНОЙ ФОТООКИСЛЕННОЙ ФОРМЫ ХЛОРОФИЛЛА

(Представлено академиком А. А. Баевым 19 X 1973)

В связи с тем, что в настоящее время весьма распространенной является точка зрения о важной роли обратимого фотоокисления хлорофилла при его фотосенсибилизирующем действии на реакции фотосинтеза, изучение свойств этого пигмента и его аналогов — в различных состояниях быть обратимым фотохимическим донором электрона представляет первостепенный интерес. Этому вопросу за последние несколько лет было посвящено значительное число работ с применением разнообразных методов как в СССР, так и за рубежом (1-13). Особый интерес вызывало взаимодействие хлорофилла с хинонами, так как считается вероятным, что пластохинон и убихинон служат первичными акцепторами электрона соответственно в растительном и бактериальном фотосинтезе.

В наших работах (2, 8, 14) было показано, что интенсивность взаимодействия хлорофилла и его аналогов с хинонами и рядом других соединений *in vitro* в сильной степени зависит от кислотно-основных условий реакционной среды. Слабокислая среда благоприятствует этой реакции, что позволило обнаружить в спиртовых растворах хлорофилла с pH 3-6, содержащих *n*-бензохинон, электродную активность (фотопотенциал) образующихся окисленных продуктов и при пониженной температуре снять их спектр поглощения (2, 8, 14).

В первых сообщениях по этому вопросу (2) мы предположили, что электродно-активная окисленная форма хлорофилла, устойчивая в слабокислой среде при низкой температуре, представляет собой положительно заряженный катион-радикал пигмента. В пользу этого говорит ее неустойчивость при комнатной температуре, электродная активность и способность к быстрой реакции при низкой температуре с рядом восстановителей и позже установленное появление сигналов э.п.р. (15). Однако дальнейшие исследования этой реакции показали возможность того, что окисленное соединение, получающееся в кислой среде, электродную активность и спектр поглощения которого мы непосредственно измеряем, является не первичной формой ион-радикала, а уже несколько более стабильным продуктом изменения последнего. Основанием для подобного предположения были данные, полученные с хлорофиллом *b*, свидетельствующие о двуступенчатости его фотоокисления (16, 17), и значительная устойчивость даже при комнатной температуре соответствующего продукта фотоокисления бактериовиридина (18). К таким же выводам пришли Бобровский и Холмогоров на основании своих опытов с твердыми растворами пигментов при низкой температуре (12).

В настоящей работе были получены дополнительные данные о реакционной способности электродно-активной окисленной формы хлорофиллов а и *b* на примере ее взаимодействия с лейкоформами некоторых красителей, в частности кристаллического фиолетового (ЛКФ) и малахитового зеленого (ЛМЗ). Основанием для использования последних послужил факт, что они

легко окисляются хиноном в слабокислой среде при комнатной температуре при освещении красным светом, если в растворе присутствует хлорофилловый пигмент (11). Пигмент, следовательно, служит в этих условиях эффективным фотосенсибилизатором для взаимодействия ЛКФ или ЛМЗ и хинона. В темноте ЛКФ и ЛМЗ с хиноном реагируют очень медленно или почти не реагируют. Фотосенсибилизированная реакция замедляется при повышении рН и прекращается при рН около 6–7.

На основании предыдущих работ (14) можно считать весьма вероятным, что в слабо кислой среде вышеупомянутая фотосенсибилизированная реакция проходит через этап первичного фотоокисления пигмента хиноном с последующей реакцией образовавшейся лабильной окисленной формы пигмента с лейкооснованием. Если электродно-активная окисленная форма хлорофилла, спектр которой мы измеряли при низкой температуре (2), пол-

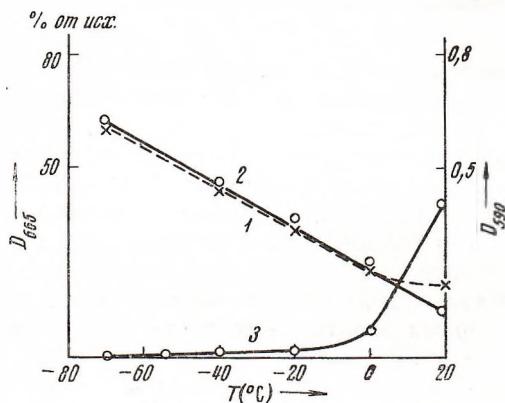


Рис. 1. Влияние присутствия ЛКФ на скорость реакции фотоокисления хлорофилла а падрабеохиноном в этаноле в зависимости от температуры. 1 – величина уменьшения максимума хлорофилла при  $\lambda$  665 мкм при 5 мин. освещении красным светом; 2 – то же в присутствии ЛКФ ( $10^{-5}$  M); 3 – зависимость скорости фотосенсибилизированного окисления ЛКФ от температуры; увеличение поглощения при  $\lambda$  590 мкм

ностью идентична промежуточной окисленной форме, образующейся при фотосенсибилизации, то первая должна легко реагировать с добавленным лейкооснованием. Однако опыт показал, что этого не происходит. Добавление лейкооснования при температуре  $-70$ ,  $-100^{\circ}$  не приводит к исчезновению окисленной формы и возвращению исходного спектра поглощения пигмента. Ранее нами было отмечено (2, 17), что относительно устойчивая электродно-активная окисленная форма хлорофиллов а и б быстро реагирует при низкой температуре только с достаточно сильными восстановителями типа аскорбиновой кислоты, причем интенсивность этого взаимодействия уменьшается при дальнейшем понижении температуры. Следует отметить в связи с этим, что фотосенсибилизированное хлорофиллом окисление хиноном вышеупомянутых лейкооснований при низкой температуре также не происходит (рис. 1, 3). Достаточно интенсивная сенсибилизированная реакция наблюдается только в случае применения феофитинов а и б и протофеофитина.

Вышеизложенное подтверждает, что образующаяся в результате первичной фотохимической реакции хлорофилла с хиноном путем отнятия электрона от хлорофилла весьма лабильная окисленная форма пигмента, типа ион-радикала, легко переходит в более устойчивое состояние, возможно, путем димеризации. Переходу в такое состояние благоприятствует слабокислая среда и низкая температура. Это делает маловероятным предположение, что стабилизация осуществляется вследствие отдачи пигментом протона.

Если в сфере реакции присутствует, кроме пигмента и хинона, еще донор электрона, то происходит, по-видимому, конкуренция между реакцией превращения катион-радикала пигмента в более устойчивую форму (димер?) и его реакцией с донором. Константы скоростей этих реакций и, следовательно, относительный выход их продуктов зависят от окружаю-

щих условий. Низкая температура ( $-70$ ,  $-100^\circ$ ) и слабокислая среда создают, вероятно, настолько благоприятные условия для перехода катион-радикала пигмента в «устойчивую» форму, что последняя легко образуется не только в отсутствие донора электрона, но даже в присутствии таких доноров, как ЛКФ и ЛМЗ. На рис. 1 показано, что скорость изменения спектра хлорофилла при реакции с хиноном в кислом спирте почти одинакова в присутствии и в отсутствие ЛКФ. Следует принять во внимание также, что присутствие значительного количества протонов может препятствовать при низкой температуре отделению протона от лейкооснования с образованием  $\text{LK}\text{F}^-$ , способной прореагировать с  $\text{Xl}^+$ . Наряду с возможностью димеризации лейкооснований и уменьшением подвижности молекул при низкой температуре это приводит к тому, что при такой температуре сенсибилизированного окисления лейкооснований хиноном не происходит. При комнатной температуре отношения, очевидно, заметно меняются. Катион-радикал пигмента труднее димеризуется, лейкооснования также находятся в мономерной форме и легче приближаются своими реакционными центрами к катион-радикалу в момент его образования и успевают с ним прореагировать. В результате наблюдается заметное протекание фотосенсибилизированной реакции.

Выше было указано, что при низкой температуре сенсибилизированная реакция окисления ЛКФ хиноном наблюдается только в присутствии феофитинов. Это, возможно, объясняется тем, что скорость изменения окисленного катион-радикала феофитина не так велика, как у хлорофилла, в результате чего его реакционная способность по отношению к донору увеличивается. Большая активность катион-радикала феофитина по сравнению с хлорофиллом была отмечена в работе <sup>(19)</sup>. Как уже давно было установлено, склонность к димеризации невозбужденных молекул в разбавленных растворах в неполярных растворителях у безмагниевых пигментов гораздо ниже, чем у соответствующих магниевых производных. Возможно, что подобное соотношение для более активных радикальных форм существует и в полярном спирте <sup>(20)</sup>. Следует подчеркнуть, что скорость сенсибилизированной феофитинами реакции окисления ЛКФ хиноном также выше, чем в случае хлорофиллов и при комнатной температуре.

В связи с большей сенсибилизирующей активностью феофитинов, более склонных к фотовосстановлению, чем к фотоокислению, может возникнуть сомнение в правильности утверждения, что в этом случае сенсибилизация идет через первичное фотохимическое взаимодействие пигмента-сенсибилизатора с хиноном с образованием  $\text{Xl}^+$ . Можно представить, что первичной реакцией является фотовосстановление пигмента, т. е. осуществляется «восстановительный» путь. Однако все наши попытки обнаружить прямую реакцию лейкооснований с пигментами при  $\text{pH}$  спирта ниже  $6,5-7,0$  не увенчались успехом. Не были обнаружены также изменения спектра при освещении раствора хлорофилла или феофитина, содержащего ЛКФ или ЛМЗ в пиридине или этаноле с  $\text{pH} > 7$ . В последних наблюдается только довольно значительный и быстро обратимый отрицательный фотопотенциал, свидетельствующий об образовании некоторого количества неустойчивого электродноактивного восстановленного соединения пигмента. Однако «восстановительный» путь, по-видимому, не осуществляется и в этих условиях, так как при  $\text{pH} > 7$  сенсибилизированная реакция окисления лейкооснований хиноном вообще не идет. Таким образом, наличие «окислительного» пути сенсибилизации в кислой среде не может вызвать сомнения.

На основании вышеприведенного мы можем считать показанным, что обнаруженная нами электродно-активная окисленная форма с максимумом поглощения для хлорофилла а около  $470$  м $\mu$  и для хлорофилла b около  $560$  м $\mu$  не является первичным катион-радикалом, а продуктом его изменения, причем такого, что радикальная природа, обнаруживаемая по

сигналу э.п.р., в нем сохраняется, но химическая активность заметно падает, возможно вследствие стерических причин.

Институт фотосинтеза  
Академии наук СССР  
Пущино-на-Оке

Поступило  
18 X 1973

Институт биохимии им. А. Н. Баха  
Академии наук СССР  
Москва

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> В. Б. Евстигнеев, А. Н. Теренин, ДАН, 81, 223 (1951). <sup>2</sup> В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, 165, 1435 (1965); 174, 476 (1967); Биофизика, 11, 593 (1966); 14, 43 (1969). <sup>3</sup> А. А. Красновский, Н. Н. Дроздова, ДАН, 150, 1378 (1963); 153, 721 (1963). <sup>4</sup> Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский, Биохимия, 30, 605 (1965); ДАН, 195, 1222 (1970); 207, 988 (1972). <sup>5</sup> А. К. Чибисов, Photochem. Photobiol., 10, 331 (1969). <sup>6</sup> В. В. Евстигнеев, Progr. in Photosynth. Res., 2, 733 (1969). <sup>7</sup> G. Tollin, G. Green, Biochim. et biophys. acta, 60, 524 (1962); 66, 608 (1963). <sup>8</sup> В. Б. Евстигнеев, Молекулярная фотоника, «Наука», 1970, стр. 178. <sup>9</sup> R. A. White, G. Tollin, Photochem. Photobiol., 14, 15 (1971); 14, 43 (1971). <sup>10</sup> G. Shergman, M. Kogin, H. Linschitz, Photochem. Photobiol., 16, 499 (1972). <sup>11</sup> И. И. Дилунг, И. Н. Чернюк, ДАН, 140, 162 (1961); 156, 149 (1964); ЖФХ, 37, 1100 (1963). <sup>12</sup> А. П. Бобровский, В. Е. Холмогоров, Оптика и спектроскопия, 30, 32 (1971); ДАН, 208, 1472 (1973). <sup>13</sup> K. Seifert, H. T. Witt, Naturwiss., 55, 219 (1968). <sup>14</sup> В. Б. Евстигнеев, Биофизика, 15, 239 (1970). <sup>15</sup> В. Б. Евстигнеев и др., Биофизика, 16, 431 (1971). <sup>16</sup> В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, 174, 476 (1967). <sup>17</sup> В. Б. Евстигнеев, Н. А. Садовникова, Г. Д. Оловянишникова, ДАН, 187, 1184 (1969). <sup>18</sup> В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, Г. Д. Оловянишникова, Молек. биол., 1, 59 (1967). <sup>19</sup> В. А. Кузьмин, А. К. Чибисов, Проблемы биофотохимии, «Наука», 1973, стр. 44. <sup>20</sup> В. Б. Евстигнеев, Изв. АН СССР, сер. физ., 23, 71 (1959).