

А. Ю. БОРИСОВ

К ВОПРОСУ О МЕХАНИЗМЕ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ КАРОТИНОИДОВ ПРИ ФОТОСИНТЕЗЕ

(Представлено академиком Н. Н. Семеновым 8 I 1974)

Известно (¹) и др.), что каротиноиды эффективно защищают хлорофиллы (Хл) *in vivo* от необратимого фотоокисления кислородом.

Мы показали для широкого круга фотосинтезирующих организмов (пурпурные бактерии, зеленые бактерии, растения), что процесс миграции энергии индуцированных светом электронных возбужденных состояний от пигментной «антенны» (порядка сотен молекул различных хлорофиллов и вспомогательных пигментов) и процесс локализации энергии электронных возбуждений на реакционном центре, где происходит первичное разделение разноименных зарядов и стабилизация во времени, осуществляются практически полностью по синглетным уровням (²⁻⁶). Максимально возможная величина квантового выхода триплетных состояний хлорофилла *in vivo* (верхний предел) была оценена для различных организмов (^{7, 8}) как 1–3%. Нижний предел, исходя из допущения о неизменности величины константы интеркомбинационной конверсии для хлорофилла *in vitro* и *in vivo*, оценен как $\approx 0,05-0,1\%$.

Одновременная регистрация в суспензиях фотосинтезирующих клеток времени жизни и выхода флуоресценции хлорофилла в функции доли активных реакционных центров, которые конкурируют с флуоресценцией за электронные возбужденные состояния, позволила впервые получить раздельные величины флуоресцентных времен жизни для фоновой и фотосинтетической фракций хлорофиллов.

Для основной ($\approx 90\%$) фотосинтетической фракции хлорофилла было доказано, что это время при активном фотосинтезе целиком определяется скоростью доставки синглетных электронных возбуждений от хлорофильной «антенны» на реакционные центры (^{3, 4, 7}).

Показано, что эта миграция энергии осуществляется за время на 1,5–2 порядка меньшее, чем было ранее принято в литературе, так как предыдущие исследователи ошибочно трактовали более сильное свечение фоновой фракции хлорофиллов ($\tau \approx 1$ нсек.) как фотосинтетическое. Для различных организмов были получены следующие значения флуоресцентных времен жизни основной фракции хлорофилла при активном фотосинтезе: 8–30 псек. для зеленых и пурпурных бактерий (²⁻⁴), меньше 30 псек. для фотосистемы I растений (^{5, 6}). Данные для фотосистемы I были подтверждены Сейбертом и Альфано (⁹), которые уточнили нашу оценку до 10 псек.

В настоящей работе с учетом вышеприведенных фактов предлагается объяснение механизма защитного действия каротиноидов по отношению к необратимому фотоокислению хлорофиллов кислородом *in vivo*.

Теоретический анализ. Рассмотрим возможные фотопроцессы *in vivo* с участием возбужденных молекул хлорофиллов.

А. Первичная локализация энергии на реакционных центрах. Определенное нами время развязывания этого процесса $\approx (1-3) \cdot 10^{-11}$ сек. позволяет сделать вывод о невозможности его осуществления механизмом фотохимической реакции, лимитируемой диффузией (^{2, 4}). Следовательно, это процесс первого порядка, осуществляющийся

$$V_e = K_e [S^*], \quad (1)$$

где V_e — скорость процесса; K_e — соответствующая константа первого порядка (если квантовый выход этого процесса $\phi_e \rightarrow 1$, то $K_e \rightarrow \tau_s^{-1}$, при этом τ_s — время жизни флуоресценции хлорофилла при активном фотосинтезе); $[S^*]$ — концентрация молекул хлорофилла в синглетном возбужденном состоянии.

Б. Взаимодействие фотовозбужденного хлорофилла с кислородом. По-видимому, эффективность этих процессов должна определяться локальной концентрацией кислорода $[O_2]$ в непосредственном соседстве с молекулами Хл. Следовательно, имеем

$$V_s = K_s [O_2] [S^*], \quad (2a)$$

$$V_T = K_T [O_2] [S^*], \quad (2b)$$

V_s и V_T — скорости необратимых реакций с кислородом соответственно синглетно и триплетно возбужденных молекул хлорофилла, где $[S^*]$ и $[T^*]$ их соответствующие концентрации; K_s , K_T — соответствующие константы скорости второго порядка.

Нетрудно показать, что

$$[S^*] = \tau_s \int_{\lambda} J(\lambda) [1 - 10^{-D(\lambda)}] d\lambda, \quad (3a)$$

$$[T^*] = \phi_T \tau_T \int_{\lambda} J(\lambda) [1 - 10^{-D(\lambda)}] d\lambda, \quad (3b)$$

где τ_s , τ_T — соответственно времена жизни молекул Хл в первом синглетно-возбужденном (обычно измеряется через флуоресценцию) и триплетном состояниях; $J(\lambda)$ — спектральное распределение возбуждающего света, выраженное в единицах эйнштейн \cdot сек $^{-1}$; $D(\lambda)$ — спектральное распределение абсорбции Хл объекта (если сопровождающие пигменты поглощают в области $J(\lambda)$, то соответствующие коэффициенты, отражающие долю мигрирующих от них на Хл квантов, должны умножаться на их доли абсорбции); ϕ_T — квантовый выход заселения триплетного состояния у Хл «антенны» (долей Хл реакционных центров, у которых о величине ϕ_T ничего не известно, можно просто пренебречь).

Из уравнений (2а, б) и (3а, б) легко получаем

$$\frac{V_s}{V_T} = \frac{K_s}{K_T} \cdot \frac{\tau_s}{\phi_T \cdot \tau_T}. \quad (4)$$

В соответствии с вышеприведенными оценками для верхней и нижней границ значений ϕ_T in vivo имеем

$$5 \cdot 10^{-4} \leq \phi_T \leq 3 \cdot 10^{-2}.$$

Что касается величины K_T , то в большом количестве исследований реакций кислорода с различными хлорофиллами в растворах показано, что она, как правило, близка к предельно возможному значению для диффузионных процессов около 10^{10} М $^{-1}$ \cdot сек $^{-1}$ (см. например ⁽¹⁰⁾). Следовательно, если предположение о диффузионной природе процессов необратимого окисления Хл кислородом верно, то величина K_s не может превысить K_T и даже в худшем случае их отношение приблизительно равно единице. Действительно, K_s и K_T различаются лишь за счет реакционной способности молекул Хл в S^* - и T^* -состояниях. Однако, если T^* -состояния и характеризуются несколько меньшей избыточной электронной энергией, то они вполне компенсируют это обстоятельство за счет своей бирадикальной природы. Подставляя даже наименьшие значения ($\phi_T = 5 \cdot 10^{-4}$ и $K_T \cdot K_s^{-1} = 1$)

в формулу (4), получаем

$$\frac{V_T}{V_S} = 5 \cdot 10^{-4} \frac{\tau_T}{\tau_S}.$$

Если использовать наши новые данные для τ_S , а для τ_T взять характерные значения для хлорофиллов в растворах порядка 10^{-3} сек. (^{7, 10}), то получим $V_T \geq 10^3 \cdot V_S$, т. е. несмотря на ничтожный квантовый выход заселения триплетов Хл эффективность необратимого окисления через них была бы по крайней мере в 10^3 раз больше, чем через синглеты. Однако, недавно Матиссу (¹¹) удалось зарегистрировать *in vivo* триплеты Хл у растений. Время их гибели оказалось равным $\tau_T \simeq (2-4) \cdot 10^{-8}$ сек. (¹¹). Вряд ли это можно объяснить возрастанием величины K_T *in vivo* на 4,5 порядка по сравнению с раствором. Сопоставляя же эти данные с фактом защитного действия каротиноидов, можно сделать подтверждающий данные Матисса вывод, что столь сильное сокращение *in vivo* объясняется миграцией энергии с триплетов Хл на триплеты каротиноидов. С учетом данных (¹¹) по τ_T получаем примерно

$$V_T \simeq (0,1-20) V_S,$$

т. е. приблизительно равные эффективности фотоокисления Хл как в T^* -, так и в S^* -состояниях.

Таким образом для ослабления необратимой деструкции *in vivo* при взаимодействии фотовозбужденных молекул хлорофиллов с кислородом природы в процессе эволюции пошла по пути резкого (на 2 порядка для синглетных и 4,5 порядка — триплетных состояний) сокращения времени пребывания их в этих состояниях. Для реализации этого положения первичный процесс фотосинтеза происходит в комплексе молекул, а триплеты гасятся за счет эффективной миграции энергии на специальные, универсальные для всех фотосинтезирующих организмов пигменты — каротиноиды.

Следствие 1. Если не каждая молекула хлорофилла имеет свой собственный партнер-тушитель, то должна быть обеспечена эффективная миграция энергии по триплетным уровням самого хлорофилла, для чего необходимы перекрытия орбиталей π -электронов их тетрапирольных колец.

Следствие 2. У бескаротиноидных мутантов, а также у фотосинтезирующих организмов, выращенных при нарушенном синтезе каротиноидов, время жизни и концентрация триплетных состояний хлорофилла должны быть существенно больше, чем у нормальных организмов.

Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова

Поступило
4 I 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Р. Станиер, В сборн. Структура и функция фотосинтетического аппарата, стр. 56, М., 1962. ² А. Ю. Борисов, В. И. Годик, Biochim. et biophys. acta, v. 223, 441 (1970). ³ А. Ю. Борисов, В. И. Годик, J. Bioenerget., v. 3, 241 (1972). ⁴ А. Ю. Борисов, В. И. Годик, J. Bioenerget., v. 3, 515 (1972). ⁵ А. Ю. Борисов, М. Д. Ильина, Биохимия, т. 36, 825 (1971). ⁶ А. Ю. Борисов, М. Д. Ильина, Biochim. et biophys. acta, v. 305, 364 (1973). ⁷ А. Ю. Борисов, В. И. Годик, А. К. Чубисов, Молекулярная биология, т. 4, 4, 500 (1970). ⁸ E. L. Barsky, A. Yu. Borisov, J. Bioenerget., v. 3, 275 (1972). ⁹ M. Seibert, R. R. Alfano, In: Proceedings of American Soc. Photobiol., Communication MAM-C3, Florida, June, 1973. ¹⁰ G. Porter, Proc. Roy. Soc. A, v. 245, 238 (1958). ¹¹ J. Breton, P. Mathis, C. R., v. 271, D, 1094 (1970).