

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, А. Н. ЛУГАНСКАЯ

ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ МЕТИЛВИОЛОГЕНА И ФЕРРЕДОКСИНА В ВОДНЫХ СРЕДАХ В ПРИСУТСТВИИ КИСЛОРОДА

В водных растворах детергентов фотосенсибилизированное восстановление метилвиологена тиомочевинной в присутствии кислорода происходит значительно активнее, чем в анаэробных условиях. Реакция протекает в две стадии: первая, фотохимическая, представляет собой фотосенсибилизированное пигментами окисление тиомочевинны кислородом, в результате которого происходит образование более активного, чем исходная тиомочевина, восстановителя, который и взаимодействует с метилвиологеном в темновой стадии реакции (¹, ²).

В данной работе фотосенсибилизированное восстановление метилвиологена и ферредоксина изучалось в водных средах, без применения детергентов, с использованием в качестве фотосенсибилизатора гематопорфирина. Фотореакции исследовались параллельно в аэробных и анаэробных условиях.

В трубку Тунберга, приспособленную для спектрофотометрических измерений, помещали раствор пигмента (10^{-6} – 10^{-5} М) в боратном буфере с донором электрона (0,1 М тиомочевинны), в «головку» трубки — раствор акцептора электрона ($5 \cdot 10^{-4}$ М метилвиологена или $1,7 \cdot 10^{-5}$ М ферредоксина). Растворы сливались после вакуумирования трубки Тунберга масляным насосом. В опытах на воздухе все компоненты реакции находились в трубке без откачивания. Раствор освещали «белым» светом киноламп 300 Вт (10^5 эрг/см²·сек) через конденсор и водяной фильтр.

Для предотвращения возможной диффузии кислорода из воздуха в реакционную среду при механическом перемещении трубки освещение неподвижной трубки осуществлялось непосредственно в кюветодержателе спектрофотометра. Во время освещения сфера спектрофотометра закрывалась заслонкой, а во время измерений шторка, пропускающая излучение осветителя, закрывалась и одновременно открывалась сфера спектрофотометра.

Восстановление метилвиологена. Фотосенсибилизированное восстановление метилвиологена тиомочевинной в водной среде в вакууме протекает медленно и неглубоко; скорость реакции и ее глубина значительно увеличиваются в присутствии кислорода (рис. 1), так же как и в описанных ранее опытах (¹, ²). Реакция в аэробных условиях наблюдается начиная от pH 8,5. С повышением pH раствора скорость реакции увеличивается (рис. 2).

Реакцию удастся разделить на две стадии: световую и темновую. Вначале раствор гематопорфирина с тиомочевинной освещался 30 мин., затем реакционная смесь была вакуумирована и в темноте к ней был прилит раствор метилвиологена из «головки» трубки Тунберга. При этом наблюдалось восстановление метилвиологена. Этот опыт показывает, что световой стадией реакции является фотосенсибилизированное гематопорфирином окисление тиомочевинны кислородом воздуха с образованием активных восстановителей, способных к темновому восстановлению метилвиологена.

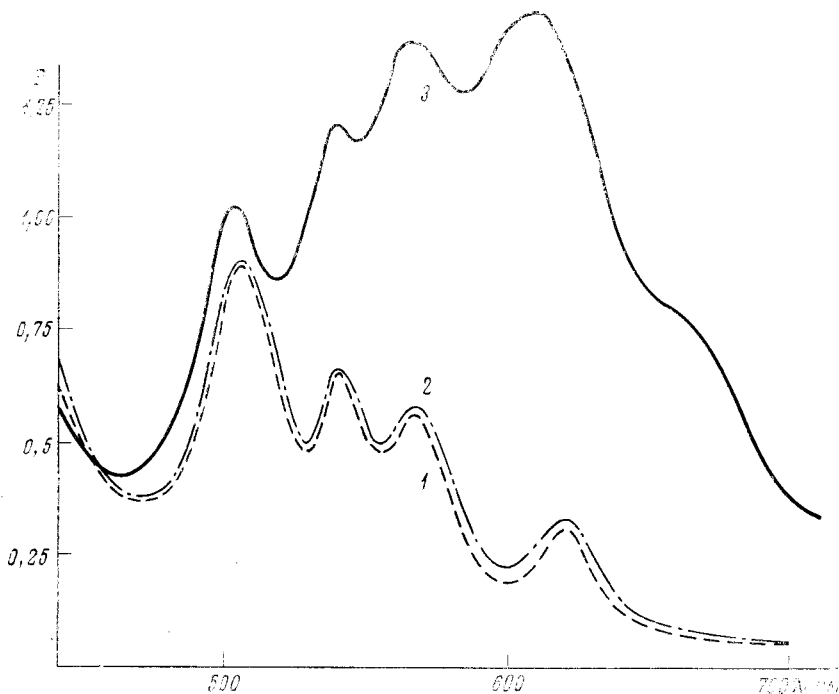


Рис. 1. Фотосенсибилизированное гематопорфирином восстановление метилвиологена тиомочевинной в аэробных и анаэробных условиях (5 мл водного раствора гематопорфирина pH 10, 10^{-4} M метилвиологен, 0,08 M тиомочевина). 1 — спектр раствора до освещения, 2 — через 25 мин. освещения в вакууме, 3 — через 25 мин. освещения на воздухе

Были проведены опыты по установлению времени жизни этих активных восстановителей. Раствор метилвиологена прибавлялся из «головки» трубки Тунберга к реакционной смеси через определенные промежутки времени после освещения. Оказалось, что степень восстановления метилвиологена через 24 часа снижалась примерно наполовину, а через двое суток восстановления метилвиологена вообще не наблюдалось. Таким образом, активные восстановители являются сравнительно устойчивыми и долгоживущими соединениями.

Наряду с этим возможно участие в реакции более короткоживущих продуктов сенсибилизированного окисления тиомочевины. В настоящее время в литературе дискутируется вопрос об участии в фотосенсибилизированном окислении тиомочевины синглетного кислорода (³). В этом случае можно было ожидать образования супероксидного анионрадикала кислорода, который также может быть ответственным за увеличение глубины и скорости восстановления метилвиологена тиомочевинной в присутствии кислорода.

Известно, что фермент супероксиддисмутаза (СОД) замедляет реакции, протекающие при участии супероксида (⁴). Опыты с СОД проводились различными способами. В опыт бралось от 30 до 100 мкг СОД. Параллельно исследовались реакции в присутствии и в отсутствие СОД при различных значениях pH. В одной части опытов СОД добавлялась к реакционной смеси, содержащей все компоненты реакции, и фотосенсибилизированное восстановление метилвиологена тиомочевинной в водной среде проводилось в аэробных условиях. В реакциях с разделением стадий в одних опытах СОД помещалась в «головку» трубки Тунберга и добавлялась к остальной реакционной смеси после ее предварительного освещения на воздухе и последующего вакуумирования. В других опытах СОД находилась в трубке вместе с гематопорфирином и тиомочевинной, куда

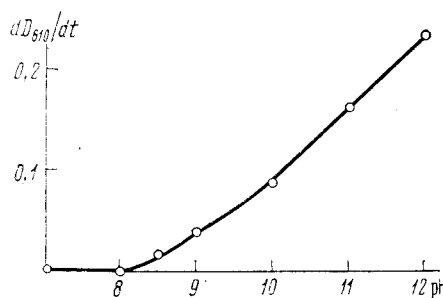


Рис. 2

Рис. 2. Скорость фотосенсибилизированного гематопорфирином восстановления метилвиологена тиомочевинной в водной среде в зависимости от pH раствора в аэробных условиях. 2 мин. освещения

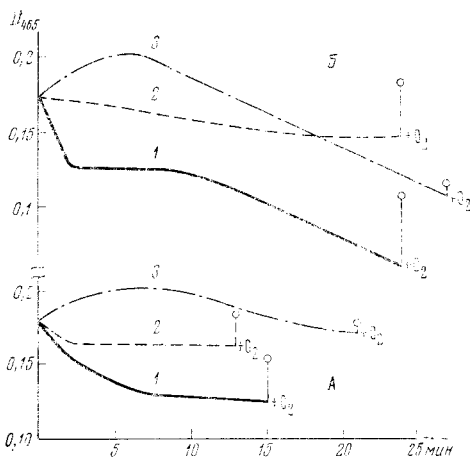


Рис. 3

Рис. 3. Кинетика фотосенсибилизированного гематопорфирином восстановления ферредоксина тиомочевинной в водных буферных растворах. А — pH 9, Б — pH 11. 1 — ферредоксин, гематопорфирин, тиомочевина + O_2 ; 2 — ферредоксин, гематопорфирин, тиомочевина — O_2 ; 3 — гематопорфирин, тиомочевина + O_2

после освещения в присутствии кислорода и дальнейшего вакуумирования добавлялся из «головки» трубки Тунберга в темноте метилвиологен. В этих опытах не удалось установить влияния СОД на скорость и конечную глубину восстановления метилвиологена. Опыты могут свидетельствовать о том, что супероксидный анион-радикал кислорода не участвует в восстановлении метилвиологена, хотя не исключена фотосенсибилизированная деструкция СОД в этих условиях.

Восстановление гематопорфирина. Ранее было показано, что в отсутствие акцепторов электрона при фотосенсибилизированной реакции в аэробных условиях восстановлению подвергается пигмент-сенсибилизатор (хлорофилл а), образуя красную восстановленную форму (²). В данной работе исследовалась возможность фотосенсибилизированного восстановления гематопорфирина тиомочевинной в основных средах в аэробных и анаэробных условиях.

Освещение раствора пигмента с тиомочевинной в вакууме при pH 9—11 приводит к небольшому увеличению оптической плотности в области 660—670 нм, тогда как остальной спектр поглощения пигмента остается без изменений. Встряхивание с воздухом после окончания реакции не вызывало обратимости в спектре поглощения пигмента.

В присутствии кислорода освещение гематопорфирина с тиомочевинной ведет к снижению оптической плотности по всему спектру пигмента, параллельно с чем наблюдается рост максимума при 650—660 нм. При 465 нм в первые минуты освещения наблюдается небольшое увеличение поглощения, которое снижается при дальнейшем освещении. Обратимые изменения поглощения в максимумах 465 и 655 нм, наблюдаемые при энергичном встряхивании реакционной смеси с воздухом после окончания освещения, указывают на восстановление гематопорфирина тиомочевинной в присутствии кислорода.

Фотовосстановление ферредоксина. Касснер и Камен, используя в качестве доноров электрона аскорбиновую кислоту и дитиоэритритол, наблюдали фотосенсибилизированное восстановление ферредоксина в трис-буферном растворе pH 7,85—7,9. В качестве фотосенсибилизатора использован копропорфирин (³).

В нашей работе использовался лиофилизированный ферредоксин из спируллины с молекулярным весом 12 000 и коэффициентами экстинкции в максимумах 420 и 465 нм соответственно $9,7 \cdot 10^4$ и $8,8 \cdot 10^4$ (⁶). Восстановление ферредоксина тиомочевинной изучалось нами как в аэробных, так и анаэробных условиях. Поскольку максимум поглощения ферредоксина при 420 нм экранируется поглощением гематопорфирина, наблюдение за ходом реакции проводилось по изменению поглощения в максимуме 465 нм.

В первые минуты освещения в вакууме растворов, содержащих ферредоксин, тиомочевину и гематопорфирин в водном буферном растворе при рН 9–11, наблюдалось падение поглощения при 465 нм. Пуск воздуха после окончания реакции приводил к обратимости в спектре поглощения, причем *D* при 465 нм превышало исходное значение, наблюдаемое до освещения. При реакции в аэробных условиях падение в максимуме поглощения ферредоксина при освещении достигало большей величины, нежели при реакции в вакууме. На рис. 3 показано изменение поглощения в максимуме 465 нм от времени освещения. Пунктирная кривая показывает фотосенсибилизированное восстановление тиомочевинной пигмента в аэробных условиях в отсутствие акцептора электрона. Поскольку в первые минуты освещения у самого гематопорфирина наблюдается подъем оптической плотности в области 465 нм, падение *D* в этом максимуме в присутствии ферредоксина может свидетельствовать о восстановлении последнего.

При реакции на воздухе достигается от 35 до 55% изменения поглощения ферредоксина при 465 нм, при реакции в вакууме — от 17 до 25%. Касснер и Камен получили 47% восстановления белка (⁵), тогда как с дитионитом наблюдалось 54–55% изменения поглощения в максимуме 465 нм (в процентах от общего поглощения) (⁷, ⁸).

Обратимое увеличение поглощения в максимуме 465 нм, наблюдаемое при пуске воздуха после окончания восстановления ферредоксина, в некоторых случаях превышает 55%. Этот результат является, по-видимому, следствием суммирования процессов окисления восстановленного ферредоксина и окисления восстановленного гематопорфирина.

Таким образом, глубина восстановления ферредоксина тиомочевинной в фотосенсибилизированной гематопорфирином реакции на воздухе выше, чем при аналогичной реакции в анаэробных условиях.

Полученные данные указывают на необходимость рассмотрения аналогичных реакций с участием кислорода в процессах переноса электрона при фотосинтезе. Возможно, кислород, выделяемый в результате различных реакций метаболизма, а также второй фотосистемой, может участвовать в процессах фоторегулирования путем фотосенсибилизированного окисления некоторых сульфгидрильных эндогенных доноров электрона. Образованные при этом активные соединения могли бы использоваться в качестве доноров электрона при переносе электрона к ферредоксину.

В заключение следует отметить, что лиофилизированный ферредоксин любезно предоставил нам Д. О. Холл, а супероксиддисмутазу — Р. М. Беккина, за что мы приносим им нашу искреннюю благодарность.

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

Поступило
1 IV 1975

Институт фотосинтеза
Академии наук СССР
Пушино-на-Оке

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Красновский, А. Н. Луганская, ДАН, т. 183, № 6, 1441 (1968). ² А. Н. Луганская, А. А. Красновский, Мол. биол., т. 4, № 6, 848 (1970). ³ C. S. Foote, Science, v. 162, 963 (1968). ⁴ J. M. McCord, J. Fridovich, J. Biol. Chem., v. 244, 604 (1969). ⁵ R. J. Kassner, M. D. Kamen, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 58, 2445 (1967). ⁶ D. O. Hall, K. K. Rao, R. Cammack, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 47, 798 (1972). ⁷ F. R. Whalley, K. Tagawa, D. Arnon, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 26, 633 (1963). ⁸ K. T. Fry, R. A. Lazzarini, A. San Pietro, *ibid.*, v. 50, 652 (1969).