

Рекомендуемая литература

1. Конев С.В., Волоотовский Д.Д. Фотобиология. Минск.: БГУ. 1979.
2. Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я Физико-химические основы фотобиологических процессов М. Высшая школа. 1989.
3. Смит К., Хенеуолт Ф. Молекулярная фотобиология. М.: Мир. 1972.

Дополнительная литература

4. Рубин А.Б. и др. Современные методы исследования фотобиологических процессов. М.: МГУ. 1989.
5. Рощупкин Д.И., Артюхов В.Г. Основы фотобиофизики. Воронеж.: ВГУ. 1997.
6. Митрофанов Ю.А., Олимпиенко Г.С. Индуцированный мутационный процесс эукариот М.: Наука 1980.
7. Турро Н. Молекулярная фотохимия. М. 1967.
8. Каламкарров Г.Р., Островский М.А. Молекулярные механизмы зрительной рецепции. М.: Наука. 2002.
9. Калверт Д, Питте Д. Фотохимия. М. 1968.
10. Владимиров Ю.А. и др. Биофизика. М.. 1983.

Введение: предмет и задачи фотобиологии. Закон Ламберта – Бера.

Фотобиология – наука о закономерностях и механизмах действия света

на биологические системы.

Фотобиология – наука о биологических процессах, инициированных в живых системах под действием света, поглощённым одним или несколькими хромофорами (фоторецепторами) этих систем. В основе фотобиологии лежат теоретические представления о физико-химических свойствах биологических молекул и сложных биологических структур, полученные из экспериментальных результатов при изучении фотофизических и фотохимических свойств простых и сложных органических молекул, красителей, природных и синтетических пигментов. Свет инициирует различные фотопроцессы в растворах, суспензиях, адсорбатах, слоях, упорядоченных системах, мембранах клеток, в клетках, тканях, в целых организмах. Нередко эти процессы имеют свободно-радикальную природу и продолжают в дальнейших темновых реакциях. Изучение таких процессов требует привлечения современных представлений физики, химии, биофизики и биологии. Знание механизмов первичных стадий фотобиологических процессов необходимо для понимания трансформации энергии поглощённых квантов света (фотонов) в таких явлениях как фотосинтез, зрение, повреждающее и лечебное действие ультрафиолетового и лазерного излучения. Изучение первичных стадий фотобиологических процессов неразрывно связано с использованием спектроскопических методов исследования, люминесценции, ядерного

и электронного магнитных резонансов. Всё это требует глубоких знаний и методик физико-химического эксперимента. Именно в этом содержится суть современной фотобиологии, изучающей механизмы фотостимулированных процессов. В предлагаемом курсе лекций будут рассмотрены основы спектроскопии, фотофизики и фотохимии органических соединений, биологических молекул, первичные фотофизические и фотохимические стадии, зрения, фотохимия нуклеиновых кислот, аминокислот, белков и ферментов, липидов, порфиринов, фотодинамические реакции в биосистемах с участием синглетного кислорода и АФК, фотопроцессы в коже, современные основы фотомедицины.

Отдельный фотобиологический процесс представляет собой сложную последовательность различных стадий: фотофизика – первичная фотохимия – образование и превращение промежуточных фотопродуктов – молекулярные механизмы реализации – конечный биологический эффект. Каждая стадия процесса представляет самостоятельный интерес для физика, химика и биолога. Иными словами фотобиология находится на стыке физической, химической и биологической наук.

В чем же заключаются задачи фотобиологии? Известно, что действие света в одних случаях является необходимым фактором для протекания многих биологических процессов, а в других – губительным. Широкое использование световой энергии во многих технологических процессах, в медицине и народном хозяйстве делают исследования действия света на живые системы весьма актуальным. Изучение внутриклеточных молекулярных механизмов фотобиологических процессов открывает перспективы сознательного управления ходом многих важных световых процессов, таких как фотосинтез или фитохром-зависимый морфогенез растений. С помощью избирательного повреждения жизненно важных

структур можно изучать их взаимоотношение с другими функциональными компонентами клетки, локализацию и биологическую роль. С точки зрения бионики наиболее ценные находки живой природы несомненно окажутся полезными для техники и производства (промышленный синтез продуктов питания, светотехника, телевидение, искусственные органы зрения и т.д.)

Свет представляет собой электромагнитное излучение, испускаемое нагретым или находящимся в возбуждённом состоянии веществом, воспринимаемое человеческим глазом. Одной из характеристик света является его цвет, который определяется длиной волны для монохроматического излучения, или суммарным спектром сложного излучения. Все вы наверно когда-нибудь наблюдали радугу. Часто после дождя в солнечный день на небе можно увидеть разложение видимого белого света на семицветный спектр. Радуга, возникает при преломлении и отражения (внутри капли) плоскопараллельного пучка света на сферической капле. (Чаще всего наблюдается первичная радуга, при которой свет претерпевает одно внутреннее отражение. В первичной радуге красный цвет находится снаружи дуги. Иногда можно увидеть ещё одну, менее яркую радугу вокруг первой. Это вторичная радуга, в которой свет отражается в капле два раза. Во вторичной радуге «перевернутый» порядок цветов — снаружи находится фиолетовый, а внутри красный.)

Видимый свет имеет длину волн ≈ 380 до 760 нм (от фиолетового до красного). Впервые непрерывный спектр на семь цветов разбил Исаак Ньютон. Это разбиение условно и во многом случайно. Практика художников

i_5b9bb6b3453d6606

наглядно показывала, что очень многие цвета и оттенки можно получить смешением небольшого количества красок. Стремление натурфилософов найти «первоосновы» всего на свете, анализируя явления природы, всё разложить «на элементы», привело к выделению «основных цветов», в качестве которых не сразу выбрали красный, зелёный и синий. Что собственно обусловлено природой человеческого глаза, цветовое зрение человека обусловлено наличием трёх видов световосприимчивых рецепторов на сетчатке глаза, максимумы спектральной чувствительности которых локализованы в области 420, 534 и 564 нм, что соответствует синему, зелёному и жёлтому (хотя в литературе обычно пишут "красному") цветам. Они являются базовыми, все остальные тона воспринимаются как их смешение в определённой пропорции. В Англии, например, основными цветами долго считали красный, жёлтый и синий, лишь в 1860 г. Максвелл ввел аддитивную систему RGB (красный, зелёный, синий). Эта система в настоящее время доминирует в системах цветовоспроизведения для электронно-лучевых трубок (ЭЛТ) мониторов и телевизоров.

Под светом также понимают не только видимый свет, но и примыкающие к нему широкие области спектра. Оптический диапазон длин волн включает в себя также инфракрасное от 740 нм до 2 мм и ультрафиолетовое от 380 до 10 нм.

Свет распространяется в вакууме с предельной скоростью около 300 тыс. км/с (299 792 458 м/с). Поперечно-плоская световая волна характеризуется электрическим и магнитным векторами напряженности

i_5b9bb6b3453d6606

полей, ориентированными взаимно перпендикулярно. Светой луч распространяется в направлении, перпендикулярном к электрическому и магнитному векторам. В прямом свете солнца или лампочки представлен большой набор электромагнитных волн, направления электрических векторов которых ориентированы случайным образом. Такой свет называется неполяризованным. Если электрические векторы всех волн ориентированы в одном направлении, свет будет плоскополяризованным (или линейно-поляризованным). Наряду с волновыми свет обладает корпускулярными свойствами, и тогда говорят о квантах (фотонах) света. Двойственная природа света находит отражение в соотношении Планка:

$$E = h \nu = h c / \lambda$$

где E – энергия кванта, h – постоянная Планка, равная $6,6256 \times 10^{-27}$ эрг с, ν – частота колебаний вектора, c – скорость света, λ – длина световой волны. Энергия, содержащаяся в одном моле квантов, получила название эйнштейн ($1 \text{ эйнштейн} = N h \nu$, где N – число Авогадро, равное $6,022 \times 10^{23}$).

При прохождении светового потока через вещество – происходит поглощение света. Чем выше концентрация вещества и толщина слоя раствора, тем сильнее происходит ослабление светового потока. Эти соотношения выражаются законом Ламберта – Бера:

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

где I_0 и I – интенсивность падающего на объект и вышедшего из него света соответственно, ϵ – коэффициент поглощения, характеризующий

поглощательную способность молекул вещества и зависящий от длины волны света, C – концентрация вещества, l – длина слоя.

Эффект поглощения оценивается не по абсолютным а по относительным величинам. Коэффициент поглощения $\mu = (I_0 - I)/I$ – показывает процент поглощенного, а коэффициент пропускания $T = I/I_0$ – процент прошедшего света.

Из формулы, описывающей закон, видно, что концентрация вещества прямо пропорциональна $\lg I_0/I$ – это соотношение принято называть оптической плотностью раствора (D). Оптическая плотность одномолярного раствора называется молярной экстинкцией, а коэффициент поглощения – коэффициентом экстинкции.

Данный закон широко используется в абсорбционной спектрофотометрии. Коэффициент экстинкции определяется опытным путем. Зная его и определяя оптическую плотность исследуемого раствора можно рассчитать концентрацию вещества:

$$M = D/\epsilon l$$

В биохимии спектрофотометрические методы используются для расчета активности ферментов. При этом исследуют либо убыль субстрата, либо накопление продукта реакции.

Фотобиологические процессы Свойства закона Бугера – Ламберта – Бера. Его использование в спектрофотометрическом анализе.
Фотофизические процессы перераспределения энергии.

На прошлой лекции мы остановились на рассмотрении закона Бугера – Ламберта – Бера:

$$D = \epsilon Cl \quad (1)$$

Свет различных длин волн поглощается одним и тем же веществом неодинаково. Зависимость поглощательной способности вещества от длины волны света называется спектром поглощения. Чаще всего используют зависимость $D = f(\lambda)$ или $D = f(\nu)$. Каждое вещество характеризуется специфическим спектром поглощения.

Поглощение видимого и ультрафиолетового света происходит главным образом с участием π - и n - электронов (так называемые $\pi \rightarrow \pi^*$ и $n \rightarrow \pi^*$ переходы). Звездочкой обозначается возбужденное состояние электрона. Чем длиннее система сопряженных двойных связей в молекуле, то есть чем сильнее делокализованы по системе π -электроны, тем при большей длине волны располагается самый длинноволновый максимум поглощения.

Анализируя закон Бугера – Ламберта – Бера можно выделить несколько свойств, присущих данному закону:

1. Оптическая плотность смеси двух растворов равна сумме оптических плотностей каждого из них:

$$D_{1+2} = D_1 + D_2 \quad (2)$$

2. Аналогично, оптическая плотность последовательно расположенных элементов равна сумме оптических плотностей каждого из них:

$$D_i = D \quad (3)$$

Таким образом, поскольку гомогенный раствор смеси нескольких веществ можно представить как чередование бесконечно тонких слоев растворов каждого из этих веществ в отдельности, уравнения 2 и 3 применимы не только к последовательно расположенным светофильтрам, но и к растворам смеси веществ: оптическая плотность смеси равна сумме оптических плотностей всех отдельно взятых компонентов.

В отличие от оптической плотности коэффициент поглощения раствора $(1-T)$ линеен только при малых концентрациях и оптических плотностях. 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. Количественную связь между коэффициентом поглощения $(1-T)$ и оптической плотностью D может быть представлена в виде:

$$1 - T = 1 - 10^{-D} \quad (4)$$

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

$$1 - T \approx \ln 10 D \approx 0,4343 D \quad (5)$$

Формула (5) точнее, тем меньше, чем меньше оптическая плотность раствора. При величинах коэффициента поглощения 0,1 и 0,2 (оптическая плотность соответственно при этом равна 0,045 и 0,097) ошибка в расчетах D по уравнению (5) составляет 4,5 и 10 %. При более высоких значениях

коэффициента поглощения света и оптических плотностях линейность между D и $(1-T)$ заметно нарушается.

А для биохимиков что важно? При количественном спектрофотометрическом анализе главная задача исследователя – измерить концентрации, а значит, и оптические плотности растворов с большей возможной точностью.

3. Свойство – наименьшая погрешность в определении концентрации получается при оптической плотности раствора от 0,2 до 0,8. При этом пропускание света, т.е. T = от 15 до 65 %.

Хотя вот современные приборы позволяют измерять оптическую плотность от -6 до 6.

Есть несколько способов, позволяющих добиться максимальной точности спектрофотометрического анализа:

1. Разбавление раствора.
2. Уменьшение толщины образца.
3. Подбор длины волны фотометрирования, при которой обеспечивается попадание измеряемых величин оптической плотности в оптимальные пределы.

Кроме того для качественной идентификации вещества наиболее важны следующие параметры:

1. Число максимумов с спектре поглощения.
2. Положение (длина волны) каждого максимума.
3. Значение коэффициентов поглощения в каждом из максимумов.

(Окисление Бензидина).

Нужно помнить, что закон Бугера – Ламберта – Бера выполняется не всегда. Наблюдаемые от закона отклонения могут, с одной стороны, служить помехой при количественном анализе, с другой – давать дополнительную информацию о свойствах исследуемых объектов.

1. Закон выводится из предположения, что молекулы хромофоров распределены в растворе равномерно. Если распределение неравномерно (нпр., гемоглобин в суспензии нативных эритроцитов), происходит занижение оптической плотности.

2. Подразумевается, что ϵ является константой. При высоких концентрациях хромофора может происходить взаимодействие между его молекулами (нпр., агрегация). При этом могут меняться фотофизические свойства, в т.ч. и коэффициент экстинкции.

3. Зависимость D от C может отклоняться от линейного при использовании немонахроматического света.

Монохромное излучение — электромагнитное излучение, обладающее очень малым разбросом частот, в идеале — одной длиной волны

4. В растворе под действием измеряющего света не должны сколько-нибудь заметно протекать фотохимические превращения хромофоров.

5. Интенсивность измеряющего светового пучка должна быть достаточно низка, чтобы в результате поглощения света концентрация невозбужденных молекул практически не уменьшалась в ходе измерения.

6. Если помимо поглощения образец рассеивает свет, то произойдет

завышение D .

7. Точному измерению оптической плотности может мешать люминесценция образца. Если фотоны люминесценции будут попадать на фотодетектор, то это приведет к занижению D .

При взаимодействии света с веществом может происходить преломление световых лучей и их рассеяние, либо поглощение фотонов молекулами, или то и другое вместе. Если произошло поглощение кванта света молекулой, то через $10^{-9} - 10$ с может происходить испускание части поглощенной энергии в виде кванта света с большей длиной волны; такое излучение называется люминесценцией.

Различают два вида люминесценции – флуоресценция и фосфоресценция, отличающихся по времени жизни и энергии излучаемых фотонов.

ЭЛЕКТРОННЫЕ СПЕКТРЫ - молекулярные спектры, обусловленные квантовыми переходами из одного электронного состояния молекулы в другое. Переходы, при к-рых происходит поглощение кванта электромагнитного излучения, образуют электронные спектры поглощения. Переходы, сопровождающиеся испусканием излучения, образуют электронные спектры испускания или люминесценции. Электронные спектры расположены, как правило, в видимой и УФ областях спектра, они являются ценным источником сведений о строении молекул и межмолекулярных взаимодействиях.

Каждая молекула имеет серию заполненных и свободных электронных орбиталей. На каждом заполненном энергетическом уровне могут находиться только два электрона, имеющих противоположные собственные магнитные моменты (спины). Если молекуле сообщить энергию, нпр., в форме фотона, то произойдет переход одного электрона с заполненного уровня (обозначаемого в спектроскопии S_0) на один из незаполненных уровней. Молекула при этом оказывается в электронно-возбужденном состоянии. Уровни S – называются синглетными, при переходах между ними спин электрона не меняется.

Триплетное состояние расщепляется на три подуровня. Электронное состояние с наименьшей энергией наз. основным (как правило, S_0 -состояние), остальные состояния - возбужденные (S_1 , S_2 , T_1 , T_2 ...). У большинства известных молекул в свободном состоянии основное состояние является синглетным. Молекулы с нечетным числом электронов, к числу которых относится, напр., NO, имеют обычно дублетное основное состояние. Среди молекул, имеющих в качестве основного триплетное состояние, прежде всего выделяют мол. кислород O_2 .

Возбужденные состояния молекул, образовавшиеся в результате поглощения кванта света, как правило, быстро теряют энергию возбуждения (дезактивируются), причем механизмы дезактивации м. б. различными. Время жизни низших возбужденных S_1 -состояний колеблется для разных молекул между 10^{-10} и 10^{-7} с, для T_1 состояний от 0,0001 с до нескольких секунд. Переход из триплетного состояния в основное запрещен, так как спины электронов одинаковы. Поэтому то в состоянии T_1 молекула находится

i_5b9bb6b3453d6606

значительно дольше. Лежащие более высоко по энергии возбужденные состояния часто дезактивируются безызлучательно и имеют времена жизни менее 10^{-11} с.

У подавляющего числа известных многоатомных молекул электронные спектры поглощения определяются переходами из основного синглетного состояния S_0 в возбужденные синглетные состояния. При комнатной и более низких температурах почти все молекулы находятся на нулевом колебательном уровне. Полосы поглощения обусловлены переходами с нулевого колебательного уровня S_0 -состояния на разл. колебательные уровни S -состояний (Рисунок).

Весьма часто в многоатомных молекулах можно выделить сравнительно небольшие фрагменты, наз. хромофорными группами (хромофорами), к-рые в осн. ответственны за поглощение излучения. Электронное возбуждение при этом определяется гл. обр. изменением электронного распределения именно в локальных областях этих групп.

Спектры испускания. Многоатомные молекулы в конденсир. фазе способны заметно испускать свет лишь при переходах из S_1 - и T_1 состояний. Испускание, связанное с излучат. переходом $S_1 \rightarrow S_0$, получило назв. флуоресценции, а связанное с переходом $T_1 \rightarrow S_0$ - фосфоресценции. Возбужденные молекулы до акта испускания света успевают частично дезактивироваться и оказываются на нулевом колебательном уровне S_1 или T_1 состояния.

Итак, с определенной вероятностью из S_1 могут реализовываться следующие пути превращения энергии состояния:

1. Тепло. $S_1 \rightarrow S_0$
2. Испускание кванта флуоресценции $S_1 \rightarrow S_0 + h_{\text{фл}}$
3. Фотохимическая реакция: $S_1 \rightarrow \text{продукт}$
4. Передача энергии возбуждения другой молекуле.
5. Обращение спина и переход в триплетное состояние $S_1 \rightarrow T_1$

Пути растраты энергии из триплетного состояния:

1. Безизлучательный переход в S_0 с обращением спина: $T_1 \rightarrow S_0$
2. Испускание кванта фосфоресценции $T_1 \rightarrow S_0 + h_{\text{фос}}$
3. Фотохимическая реакция.
4. Передача энергии возбуждения другой молекуле.

На основе квазилинейчатых спектров люминесценции разработан высокочувствительный и селективный мол. спектральный анализ сложных орг. смесей. По изменению интенсивности отд. полос судят об увеличении или уменьшении кол-ва отд. компонентов смеси при изменении условий (напр., рН среды), о наличии в системе тех или иных хромофорных групп и их взаимодей., величине дипольного момента молекул, симметрии молекул и др. электронные спектры, получаемые при низких т-рах в матрицах, позволяют судить о "замороженных" свободных радикалах и их превращениях, а при разрешенной колебат. структуре дают возможность определять спектроскопич. постоянные, напр. фундам. частоты колебаний для разл. электронных состояний.

Поскольку электронные спектры молекул зависят от условий их получения (фазовое состояние вещества, температура образца, рН среды и др.), они применяются для исследований межмолекулярных взаимодействий

и их связи с внеш. условиями, особенно в тех случаях, когда эти взаимодей. велики (напр., при образовании водородных связей).

Общая характеристика фотохимических реакций

Итак, вспомним из прошлой лекции, что молекулы могут быть в основном (невозбужденном – S_0) и возбужденном состоянии.

У молекул в возбужденном состоянии электроны находятся на синглетном или триплетном уровне (S_1, S_2, T_1, T_2). Около каждого уровня показано направление спина возбужденного электрона по отношению к спину оставшегося электрона. Жирные горизонтальные линии – чисто электронные уровни энергии, тонкие (0, 1, 2, или 0', 1', 2' ...) - колебательные уровни. Прямые стрелки поглощательные и излучательные переходы; ВК – внутренняя конверсия (переход электрона без обращения спина); ИК – интеркомбинационная конверсия (переход электрона с обращением спина).

Поглощение света веществом – процесс запасания энергии молекулами вещества в виде кванта света.

Дело в том, что каждая молекула имеет серию заполненных и свободных электронных орбиталей. На каждом заполненном энергетическом уровне могут находиться только два электрона, имеющих противоположные **собственные магнитные моменты (спины)**. Поглощение кванта света приводит к переходу электрона на орбиталь с большей энергией (молекула при этом переходит на более высокий энергетический уровень).

Как видно из рисунка при переходе между синглетными уровнями спин электронов не меняется. Если же совершается так называемая интеркомбинационная конверсия из триплетного уровня в синглетный или наоборот, то происходит обращение спина электрона.

Поглощение света описывается законом Бугера – Ламберта – Бера:

$$D = \epsilon Cl \quad (1)$$

Применение закона:

Закон используется в качественном и количественном спектрофотометрическом анализе в биохимии, медицине и др. науках.

В некоторых случаях количественную оценку содержания поглощающегося света вещества в образце проводят, регистрируя не спектры поглощения, а спектры отражения. Данный способ широко используется в медицине.

Известно, что под влиянием значительных доз ультрафиолетовых лучей на коже возникает эритема, достигающая своего максимального развития через 18 - 20 часов. На месте которой к 7 - 9 дню возникает пигментация - загар. Процессы, происходящие при эритемообразовании лежат в основе обезболивающего, противовоспалительного, рассасывающего действия и используются в медицинской практике.

Специфическим биологическим действием ультрафиолетового излучения является образование эндогенного витамина D, которое происходит под в коже под влиянием небольших доз ультрафиолетовых лучей.

Показания к проведению УФ-облучения

К общим показаниям относятся:

1. профилактика солнечной недостаточности, а вместе с тем и гиповитаминоза.
2. профилактика и лечение рахита.
3. профилактика понижения общей сопротивляемости организма в зимне-осенний период.
4. профилактика возникновения инфекций.
5. профилактика понижения умственной и физической работоспособности.

К местным показаниям относится эритемотерапия при воспалительных заболеваниях внутренних органов, как, например:

1. бронхит.
2. гастрит.
3. ревматизм.
4. тонзиллит.
5. ангина.
6. бронхиальная астма.

Приборы с помощью которых проводят лечение называются биодозиметрами.

Например, биодозиметр помещают на коже живота, лампа УФ-излучателя находится на расстоянии 50 см. Облучение начинают с 0.5 мин и заканчивают 3 мин. Интенсивность эритемы определяют через 8-24 ч.

В чем принцип детекции дозы излучения. С помощью спектра отражения оценивают содержание гемоглобина в коже. Падающий монохроматический свет (I_0), проникая в кожу, ослабляется за счет поглощения. Часть света после многократного рассеяния клетками кожи выходит обратно – отражается (см. врезку). Отношение интенсивности отраженного света (I) к падающему называется отражательной способностью

$$R = I/I_0 \quad (2)$$

При эритеме, когда резко усиливается микроциркуляция и повышается содержание гемоглобина в коже, уменьшение отражательной способности в области поглощения гемоглобина (540 и 578 нм) служит количественным критерием эритемы.

Люминесценция (от лат. *lumen*, род. падеж *luminis* -свет и -escent - суффикс, означающий слабое действие) - свечение веществ, возникающее после поглощения им энергии возбуждения. По определению С.И. Вавилова люминесценцией тела в данной спектральной области называют избыток излучения над температурным при условии, что это избыточное излучение обладает конечной длительностью, превышающий период световых колебаний. Другими словами, люминесценция – это «холодное» свечение веществ. При этом в отличие от других видов свечения люминесценция характеризуется временем свечения, значительно превышающим период колебаний световой волны и составляющим от 10^{-12} с до нескольких секунд, а по некоторым данным даже до нескольких суток.

Образование электронно-возбужденных молекул может быть не только результатом поглощения ими кванта света, но и следствием химических реакций, электрического разряда и др. Поэтому в зависимости от источника энергии при возбуждении молекул говорят о разных типах люминесценции.

Люминесценцию, возникающую в результате освещения молекул, называют фотолюминисценцией. Свечение, сопровождающее химические реакции – хемилюминесценцией; слабая хемилюминесценция сопровождает, например, свободнорадикальное цепное окисление органических соединений, включая липиды. Многие живые организмы, например, светляки, бактерии, некоторые морские организмы, способны испускать довольно сильный свет в результате определенных биохимических реакций; такое свечение называют биолюминесценцией.

Свечение светлячков вызывается химическим процессом биолюминесценции в их теле. Свет излучается, когда внутриклеточный кислород соединяется с кальцием, молекулой аденозинтрифосфата (АТФ), служащей хранилищем энергии, и пигментом люциферинном в присутствии фермента люциферазы.

В физике известны явления термо-, электро-, соно-, триболлюминесценции. Эти термины указывают на то, что причиной образования электронно-возбужденных молекул в этих случаях является нагревание образцов, пропускание электрического тока, воздействие ультразвуком, трение поверхностей.

Различают два вида люминесценции – флуоресценция и фосфоресценция, отличающихся по времени жизни и энергии излучаемых фотонов.

Вернемся к нашему первому рисунку он позволяет нам объяснить эмпирические законы люминесценции, которые и послужили основой для создания этой схемы.

Закон Стокса – спектр флуоресценции лежит в более длинноволновой области по сравнению со спектром поглощения того же соединения.

На прошлой лекции я говорил, что чем длиннее система сопряженных двойных связей в молекуле, то есть чем сильнее делокализованы по системе π -электроны, тем при большей длине волны располагается самый длинноволновый максимум поглощения.

Смысл закона Стокса: средняя энергия квантов флуоресценции меньше средней энергии поглощенных квантов. На рисунке данная закономерность проявляется в том, что длина прямых стрелок вверх меньше длины стрелок вниз. О причинах мы говорили на прошлой лекции – часть энергии поглощенного фотона была превращена в тепловую энергию окружающих молекул.

Правило Каши относится к форме спектра флуоресценции при возбуждении объекта светом разных длин волн. Испускание квантов флуоресценции (фосфоресценции) всегда происходит с нижнего возбужденного уровня молекулы, независимо от того, на какой уровень был заброшен перед этим электрон в результате поглощения фотона. Это означает,

что какой бы длиной волны ни была возбуждена молекула (разные вертикальные стрелки вверх), излучение будет происходить из одного и того же состояния молекулы и спектр флуоресценции во всех случаях будет одинаковым. Следовательно, спектр люминесценции не зависит от длины волны возбуждающего излучения.

Правило Каши и закон Стокса имеют большое значение при проведении спектрофлуориметрических измерений. Для возбуждения люминесценции используют излучение с длинами волн, меньшими коротковолновой границы спектра флуоресценции. Если в растворе люминесцирует одно вещество то согласно правилу Каши на форме спектра люминесценции длина волны люминесценции возбуждения не сказывается. Это позволяет использовать спектрофлуориметрию для качественного и количественного анализа люминесцирующих веществ.

Правило Левшина или правило зеркальной симметрии утверждает, что спектры флуоресценции по форме зеркально симметричны длинноволновой полосе спектра поглощения, если она построена в шкале частот (энергий). Это связано с тем, что геометрия молекул в электронно-возбужденном и основном состоянии мало изменяется. Поэтому, свойства молекулы, в частности расстояния между колебательными подуровнями и вероятность переходов на них близки.

Закон Вавилова заключается в том, что квантовый выход флуоресценции не зависит от длины волны возбуждения люминесценции.

Квантовым выходом называют отношение числа квантов, высвеченных в виде люминесценции к числу поглощенных образцом квантов. Очевидно, что это

величина не может принимать значения от 0 до 1. Иными словами вероятность перехода молекулы из состояния S_0 в S_1 при поглощении фотона равна 1 и не зависит от длины волны поглощенного фотона. Вероятность же излучательного перехода меньше 1, так как есть некоторая вероятность безизлучательных переходов в основное состояние или другие способы растраты энергии.

Также как и поглощение люминесценция используется для качественного и количественного анализа концентраций веществ.

Если квантовый выход люминесценции больше 1%. То такие соединения легко обнаруживаются люминесцентным методом. Когда мы имеем дело с ярко люминесцирующим веществом, то флуоресцентный анализ оказывается в сотни и тысячи раз чувствительнее спектрофотометрического. Высоким квантовым выходом обладают триптофан в белках, флавины, восстановленные никотинамиддинуклеотиды (НАДН и НАДФН), витамин А, Е и др., многие лекарственные вещества.

Легко определяются люминесцентными методами канцерогенные углеводороды (3, 4-бензпирен, дибензатрацен) в воздухе городов, дыме сигарет и так далее. При возбуждении ближним УФ легко обнаруживаются грибковые инфекции волос по характерной желто-зеленой флуоресценции, дерматомикозы у животных. Яйца зараженные бактериями рода *Pseudomonas*, легко обнаруживаются по ярко-зеленой флуоресценции пигмента пиовердина, видимой даже через скорлупу.

Ярко флуоресцирующие соединения применяются в диагностике. Например, в вену человека вводят раствор флуоресцеина и через несколько

секунд наблюдают яркую, возбуждаемую УФ зеленую люминесценцию губ и глаз. Этим методом определяют время циркуляции крови и области тела с пониженным кровообращением.

Известно, что как на спектры поглощения, так и на спектры флуоресценции влияют условия среды, окружающей молекулы; наибольшее значение при этом имеет полярность окружающих молекул и их подвижность. В случае флуоресценции растворов веществ наибольшее влияние имеют диэлектрическая проницаемость и вязкость окружающей среды.

Диэлектрическая проницаемость - величина, характеризующая свойства изолирующей (диэлектрической) среды. Связана с эффектом поляризации диэлектриков под действием электрического поля. Вещества, обладающие большим электрическим диполем, имеют высокое значение диэлектрической проницаемости.

В таблице даны положения максимумов в спектрах поглощения ($\lambda_{\text{п}}$) и флуоресценции ($\lambda_{\text{фл}}$) люминесцирующего соединения диметиламинохалкона (ДМХ) в растворителях с различной полярностью (диэлектрической проницаемостью). Из таблицы видно, что с увеличением полярности растворителя от гептана к воде максимумы в спектре поглощения и, особенно, в спектре флуоресценции сдвигаются в область больших длин волн.

Объяснение этому дано на рисунке 2. Молекула ДМХ в основном состоянии имеет относительно небольшой дипольный момент $\mu_0 = 17 \cdot 10^{-30}$ Кл · м и, соответственно, умеренно сольватирована, то есть окружена ориентированными полярными молекулами растворителя, например, воды (рис.1, 1). Поглощение фотона и переход молекулы в возбужденное состояние

сопровождается увеличением дипольного момента молекулы $\mu = 77 \cdot 10^{-30}$ Кл · м (рис.1, 2). Это приводит к поляризации электронных оболочек окружающих молекул, индукционному смещению их атомов за $10^{-12} - 10^{-13}$ с и переориентации окружающих молекул (росту сольватации, рис.1, 3), что занимает уже $10^{-11} - 10^{-8}$ с. Растрата энергии на все эти процессы приводит к длинноволновому сдвигу полосы флуоресценции (короткая стрелка при переходе 3-4 на рис.1).

Дипольный момент при возбуждении может изменяться в любую сторону как по величине, так и по направлению, однако практически во всех случаях, представляющих биологический интерес, он возрастает. В эксперименте всегда наблюдают, что положение полосы флуоресценции зависит от растворителя гораздо сильнее, чем положение полосы поглощения. Например, для триптофана спектр поглощения практически не зависит от полярности растворителя (Рисунок 3), тогда как спектр флуоресценции сдвигается при переходе от неполярного к полярному растворителю примерно на 20 нм в длинноволновую сторону (Рисунок 4). Очевидно, что этот сдвиг будет выше при следующих условиях:

- 1) большое значение разности дипольных моментов в возбужденном и основном состоянии $\mu - \mu_0$,
- 2) окружающие молекулы имеют высокий дипольный момент,
- 3) подвижность окружающих молекул (текучесть среды) и время жизни возбужденных молекул τ достаточно велики, чтобы за время τ молекулы среды успели переориентироваться.

Таким образом, разница между максимумами поглощения и

флуоресценции (сдвиг по закону Стокса) будет выше в случае молекул со значительной разностью $\nu - \nu_0$, большим временем жизни возбужденного состояния и в маловязкой, полярной среде.

Важная характеристика люминесценции – скорость ее затухания после прекращения возбуждения, которая зависит от времени жизни молекул в возбужденном состоянии τ . Сразу после поглощения энергии веществом какое-то количество молекул окажется в возбужденном S_1 состоянии, из которого они начнут переходить в основное состояние S_0 с испусканием фотона:

$$S_1 \rightarrow S_0 + \nu h \quad (1)$$

Процесс, описываемый формулой (1), имеет вероятностный характер, при этом k означает вероятность $S_1 \rightarrow S_0$ перехода в единицу времени. А τ является величиной обратной k и называется средним временем жизни молекулы в возбужденном состоянии:

$$\tau = 1/k \quad (2)$$

Еще одним важным параметром является тушение. Всякое снижение квантового выхода флуоресценции может рассматриваться как процесс тушения флуоресценции. Основная причина тушения флуоресценции – взаимодействие молекул флуоресцирующего соединения с другими молекулами в среде, которые можно назвать в общем случае молекулами тушителя.

Явление длинноволнового сдвига спектра флуоресценции в полярном, невязком окружении лежит в основе применения флуоресцирующих красителей (зондов). Флуоресцентным зондом называют флуоресцирующую

молекулу, которая связывается с белками, биологическими мембранами или другими компонентами клетки нековалентными связями. В качестве зондов используют соединения, параметры люминесценции которых резко меняются в зависимости от свойств среды. Поэтому, зная локализацию зонда в клетке, можно по люминесценции судить о физических свойствах непосредственного микроокружения молекул зонда, то есть о свойствах белков, мембран, нуклеиновых кислот и других структур клеток.

В некоторых случаях компоненты клеток (например, белки, жирные кислоты и т.д.) ковалентно связывают (метят) с флуоресцирующими соединениями, в этих случаях используют термин флуоресцентные метки.

Изменение свойств среды, окружающей люминесцирующие молекулы, может отражаться не только на спектрах но и на квантовом выходе люминесценции. В некоторых случаях различия в квантовом выходе бывают весьма значительны. Так, например, квантовый выход флуоресценции красителя 1-анилинонафтален-8-сульфоната (АНС) в бутаноле равен 0,66, а в воде – 0,004; соответственно этому время затухания флуоресценции составляет в бутаноле 10,5 нс, а в воде – всего 0,55 нс.

При включении красителя в липидный слой мембран (липосомы) квантовый выход флуоресценции красителя становится $\phi = 0,29$ и $\tau = 7,0$ нс. Таким образом, при переходе красителя из водной в мембранную фазу квантовый выход флуоресценции АНС возрастает на 2 порядка. В суспензии мембран флуоресценция красителя обусловлена практически только той его частью, которая связалась с мембранами (встроилась в липидный слой); это позволяет изучать связывание с липидами (и белками) мембран АНС,

i_5b9bb6b3453d6606

который может считаться люминесцентным зондом на наличие гидрофобной фазы. Но поскольку АНС имеет отрицательный заряд, его связывание с мембранами зависит от поверхностного заряда мембран: с ростом положительного заряда связывание растёт, с ростом отрицательного – падает. Тем самым АНС можно использовать также и в качестве зонда на наличие заряда на мембранах и на белковых глобулах макромолекул.

Широко используются флуоресцентные зонды в реакциях полимеразной цепной реакции. Метод ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) стал в настоящее время признанным стандартом при исследовании ДНК и РНК. Он позволяет определять кинетику реакции и на основе полученной информации судить о наличии и исходном количестве ДНК-мишени в образце. Кроме того, метод ПЦР-РВ позволяет определять известные мутации в последовательности ДНК и их процентное содержание. Важным достоинством метода является отсутствие необходимости в пост-реакционных манипуляциях с образцами и, как следствие, снижение риска контаминации (*cotamiatio*; лат. смешение; попадание в определенную среду какой-либо примеси), сокращение времени анализа и упрощение организации ПЦР лаборатории.

Зонд для ПЦР в реальном времени является важным компонентом реакционной смеси. Он представляет собой олигонуклеотид к которому присоединены молекула флуорофора и молекула гасителя флуоресценции. Последовательность зонда подбирается таким образом, чтобы он отжигался на матрицу между прямым и обратным праймерами.

Флуоресцентные красители (флуорофоры) - это молекулы, которые при

поглощении фотона испускают свет с большей длиной волны (т.е. флуоресцируют). Существует большое число флуорофоров, отличающихся по спектру флуоресценции.

Гаситель флуоресценции - молекула, спектр поглощения которой лежит в области длин волн спектра испускания флуорофора. Тушение флуоресценции происходит благодаря безызлучательному переносу энергии от молекулы флуорофора к молекуле гасителя и рассеиванию энергии.

В двух таблицах представлены флуоресцентные красители и гасители флуоресценции.

Вот, например, краситель карбоксифлуоресцеин (FAM) представлен на следующем рисунке. Производные флуоресцеина являются наиболее распространенными флуоресцентными метками, вводимыми в олигонуклеотиды. Карбоксифлуоресцеин имеет достаточно большой молярный коэффициент поглощения и высокий квантовый выход. Кроме того, максимум возбуждения для производных флуоресцеина находится в диапазоне спектральных линий аргонового (488 нм) и Nd:YAG ([Неодим: YAG], 477 нм) лазеров, что делает этот краситель незаменимым в таких областях, как:

- ДНК анализ с лазер-индуцируемой флуоресцентной детекцией;
- микроскопия с конфокальным лазерным сканированием;
- проточная цитофлуориметрия.

На следующем рисунке представлены спектры поглощения некоторых гасителей флуоресценции. Как видно из рисунка присоединение различных гасителей к 3'-концу изменяет спектр поглощения декатимиллилата. Спектры

отличаются как по форме, амплитуде так и по максимумам.

Для совместного использования гаситель и краситель подбираются таким образом, чтобы диапазон гашения лежал в области максимума спектра испускания красителя. В следующей таблице представлены возможные комбинации красителей и гасителей.

А на рисунке варианты взаимного расположения красителей в зонде:

А. Красители располагаются на 5' и 3' концах зонда.

Б. Один из красителей внутри цепи (на тимидине или цитидине).

Принцип метода использования флуоресцентного зонда представлен на следующей схеме.

1. Зонд отжигается на одной из цепей ДНК между прямым и обратным праймерами. При этом флуоресценция флуорофора потушена.

2. Taq ДНК полимеразы расщепляет зонд. Отщепленный флуорофор испускает свет с характеристичной для него длиной волны.

3. В результате, удвоение ампликона вызывает разгорание одного флуорофора.

Таким образом, сигнал флуоресценции в ходе ПЦР возрастает пропорционально количеству продукта амплификации, что позволяет проследить кинетику реакции и судить об исходном количестве ДНК в образцах.

Теперь перейдем к рассмотрению переноса энергии электронного возбуждения.

Перенос энергии электронного возбуждения между двумя молекулами можно представить в виде схемы:

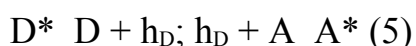


В результате переноса энергии возбужденная молекула донора энергии D^* переходит в основное состояние D , а молекула акцептора энергии переходит из невозбужденного состояния A в возбужденное A^* . Следует отметить, что донором и акцептором могут быть не обязательно молекулы разных веществ, но также и разные молекулы одного и того же вещества:



Перенос энергии между одинаковыми молекулами (который может быть многократным) называют миграцией энергии (от лат. migration – блуждание).

Одним из возможных способов переноса энергии между молекулами донора и акцептора заключается в том, что молекула D^* излучает квант флуоресценции, а молекула A его поглощает:



Такой перенос за счет реабсорбции света флуоресценции называют излучательным. При достаточно малых расстояниях между молекулами донора и акцептора перенос становится безызлучательным.

Безызлучательный перенос энергии может происходить в момент тесного контакта молекул при их кинетических соударениях.

Явление переноса энергии используется для изучения структуры биологических мембран.

Рисунок 9. а – определение толщины мембраны путем измерения эффективности переноса энергии от молекул водорастворимого донора

(вверху) на молекулы акцептора (внизу); при высоких концентрациях донора

и акцептора расстояние переноса энергии R стремится к толщине мембраны; \bar{b} – определение расположения белка на мембране. Если в части белка А, удаленной от липида на расстояние больше чем R_0 (радиус Фёрстера), имеются остатки триптофана, энергия с них не переносится на зонд, локализованный в мембране. Недоступный для тушения зондом участок А отсутствует у белка, погруженного в бислою (справа); \bar{v} – изучение агрегации белков в мембране. Недоступные для тушения зондом участки белка А образуются в местах сближения белков, если там нет зонда. С участков Б происходит перенос энергии от триптофана на зонд; \bar{z} – изучение конформационных перестроек белка по изменению эффективности переноса энергии от тирозиновых остатков на триптофановые, расстояние между донором и акцептором $R > R_0$ – перенос энергии малоэффективен, $R < R_0$ – происходит перенос энергии; \bar{d} – изучение погружения триптофановых остатков в глубь мембраны. Погруженные остатки не тушатся акцептором энергии, растворенным в водной фазе.

Характеристика фотохимических реакций

Фотохимические превращения претерпевают молекулы не в основном, а в электронно-возбужденном состоянии. Поэтому вызвать их может лишь поглощенный свет, а количество образовавшихся фотопродуктов определяется дозой – произведением интенсивности падающего света (I) на время облучения (t).

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

1. Фотораспад, при котором с разрывом химических связей происходит расщепление молекулы на радикалы, ионы или нейтральные более простые молекулы. Фотораспад наблюдается, например, при облучении большими дозами ультрафиолета аминокислот, пептидов и белков (фотолиз пептидной

связи, дезаминирование, декарбоксилирование), а также нуклеотидов и нуклеиновых кислот.

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

Фототаутомеризация – перенос атома водорода из одной части молекулы в другую.

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

3. Фотоприсоединение – присоединение к возбужденной молекуле других молекул. В зависимости от того какая молекула присоединяется, различают фотодимеризацию, фотоокисидирование и фотогидратацию.

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

Важнейшими реакциями фотоприсоединения в биологии являются реакции фотодимеризации Тимина в растворе и ДНК, а также

фотогидратации урацила в растворе и РНК.

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

5. Фотоперенос протона.

Систематика и общая характеристика фотобиологических реакций и их
основных стадий

Огромное количество фотобиологических процессов (рис. 1) может быть систематизировано как с энергетической, так и с биологической стороны. Если продукты фотобиологической реакции обладают большим, чем исходные вещества, запасом свободной энергии, то речь идет об

эндергонической реакции (фотосинтез у растений и водорослей). Законсервированная энергия квантов света используется для покрытия энергетических нужд клеток и организмов. Основным биологическим смыслом этих реакций – превращение световой энергии в химическую с последующим запасанием ее впрок.

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

С биологической, функциональной, стороны фотобиологические реакции можно подразделить на собственно физиологические и деструктивно-модифицирующие (схема 1).

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

Функционально-физиологические реакции, в свою очередь,

разделяются на энергетические, информационные и биосинтетические.

В ходе энергетических реакций световая энергия в результате синтеза новых органических молекул трансформируется в химическую. При этом суммарная свободная энергия конечных продуктов реакции выше, чем у исходных. Основная энергетическая реакция – фотосинтез, в результате которого из воды и углекислого газа за счет энергии света синтезируется глюкоза. Фотосинтез включает в себя образование богатых энергией промежуточных продуктов, например, АТФ и восстановленный НАДФ. Возникновение каждого из промежуточных продуктов фотосинтеза может рассматриваться как самостоятельная эндергоническая фотобиологическая реакция. Пигменты (хлорофилл, бактериохлорофилл и др.), непосредственно улавливающие световую энергию при фотосинтезе, не расходуются, а играют роль фотокатализатора биохимических превращений. Особой разновидностью фотосинтеза является светозависимое образование АТФ с участием бактериородопсина у галофильных бактерий.

При информационных реакциях свет через образование фотопродуктов запускает специализированные усилительные механизмы, в результате чего организм получает необходимую информацию о ситуации в окружающей среде. Отличительный признак этой группы реакций – сложная конструкция усилительного аппарата, достигающая самой высокой степени совершенства в органе зрения. Один квант света, попавший в рецепторную клетку сетчатки, вызывает передвижение огромного количества ионов, формирующих зрительный сигнал (усиление по мощности 10^5 - 10^6). Как и при энергетических реакциях, пигмент, поглощающий свет, практически не

i_5b9bb6b3453d6606 36

расходуется. поскольку его фотопревращения обратимы. К этой группе реакций можно отнести также таксисы, тропизмы, периодизмы, морфогенетические реакции.

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

Как при информационных, так и при биосинтетических реакциях существенного запасания энергии не происходит. Общим для всех функционально-физиологических реакций является отсутствие повреждений

жизненно важных макромолекулярных и надмолекулярных структур клетки. Наоборот, в ряде случаев их протекание приводит к образованию структурных элементов. Например, активный для биосинтеза хлорофилла свет, превращающий этиолированные проростки растений в зеленые, способствует формированию мембранной (ламеллярной) системы хлоропласта.

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

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

i_5b9bb6b3453d6606

преобладают не фотохимический, а тепловой эффект.

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

Мутационные реакции по своей природе близки к летальным. Результаты действия УФ-света – замена или выпадение основания в ДНК, то есть возникновение мутационной формы организма. Подобно летальным, мутационные реакции возникают и при фотодинамическом действии видимого света.

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

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

Особенностью деструктивно-модифицирующих реакций является отсутствие специальных усилительных механизмов первичного фотохимического повреждения. Более того, реакциям первых двух классов

свойственны антиусилительные механизмы, связанные с работой ферментных систем репарации и фотореактивации. Конечный биологический эффект может быть связан как с гибелью исходных молекул, так и со свойствами фотохимических продуктов, которые в ряде случаев являются не только токсинами, но и стимуляторами или модификаторами (мутации в ДНК) жизненных процессов. Поэтому наряду с основным результатом такого рода физиологических реакций – повреждением или гибелью клетки (организма) – наблюдаются и эффекты противоположного рода – стимуляция и (или) модификация жизненных процессов.

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

Несмотря на большое разнообразие фотобиологических реакций, все они характеризуются более или менее единообразной последовательностью стадий:

- 1) фотофизическая, включающая поглощение света биологически активным хромофором (акцептором), то есть молекулой, от которой начинается цепь событий, приводящих к биологическому макроэффекту: образование электронно-возбужденных состояний, внутримолекулярные процессы перераспределения энергии, межмолекулярные процессы миграции энергии;
- 2) стадия первичной фотохимии, в ходе которой образуется исходный фотопродукт, непосредственно участвующий в дальнейших химических или физико-химических превращениях;

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

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

Систематика и общая характеристика фотобиологических реакций и их основных стадий

На прошлой лекции мы рассматривали систематику и общую характеристику фотобиологических реакций и их основных стадий

Мы с вами рассмотрели, что функционально-физиологические реакции,

разделяются на энергетические, информационные и биосинтетические.

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

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

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

Мутационные реакции по своей природе близки к летальным. Результаты действия УФ-света – замена или выпадение основания в ДНК, то есть возникновение мутационной формы организма. Подобно летальным, мутационные реакции возникают и при фотодинамическом действии видимого света.

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

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

Особенностью деструктивно-модифицирующих реакций является отсутствие специальных усилительных механизмов первичного фотохимического повреждения. Более того, реакциям первых двух классов свойственны антиусилительные механизмы, связанные с работой ферментных систем репарации и фотореактивации. Конечный биологический эффект может быть связан как с гибелью исходных молекул, так и со свойствами фотохимических продуктов, которые в ряде случаев являются не только токсинами, но и стимуляторами или модификаторами (мутации в

ДНК) жизненных процессов. Поэтому наряду с основным результатом такого рода физиологических реакций – повреждением или гибелью клетки (организма) – наблюдаются и эффекты противоположного рода – стимуляция и (или) модификация жизненных процессов.

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

Несмотря на большое разнообразие фотобиологических реакций, все они характеризуются более или менее единообразной последовательностью стадий:

- 1) фотофизическая, включающая поглощение света биологически активным хромофором (акцептором), то есть молекулой, от которой начинается цепь событий, приводящих к биологическому макроэффекту: образование электронно-возбужденных состояний, внутримолекулярные процессы перераспределения энергии, межмолекулярные процессы миграции энергии;
- 2) стадия первичной фотохимии, в ходе которой образуется исходный фотопродукт, непосредственно участвующий в дальнейших химических или физико-химических превращениях;
- 3) стадия вторичной фотохимии, когда первичный фотопродукт, претерпевая спонтанные химические превращения (чаще всего с участием ближайших молекулярных соседей), преобразуется в стабильный, под которым подразумевается соединение, само по себе (в изолированном состоянии) устойчивое в течение достаточно длительных промежутков времени;

4) стадия темновых превращений, которая начинается со стабильных фотопродуктов и включает цепь биохимических (ферментативных) реакций или конформационных перестроек надмолекулярных структур и прежде всего биологических мембран;

5) конечный биологический макроэффект, развивающийся вследствие биохимических и структурных изменений, в результате которых происходят биологически значимые события: синтез богатых энергией веществ, движение биообъекта, модификация генотипа и физиологических функций и т.д.

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

Изменение свойств молекул в электронно-возбужденном состоянии.

Понятно. Что при поглощении света молекулой она будет претерпевать определенные изменения. Ее свойства в возбужденном и основном состоянии будут отличаться по многим параметрам.

Различают несколько свойств, претерпевающих изменения при возбуждении

молекул:

1. Изменение пространственной структуры молекулы
2. Изменение дипольного момента
3. Изменение кислотно-основных свойств
4. Изменение донорно-акцепторных свойств

У органических молекул с системой двойных связей при возбуждении изменяется пространственная структура. В невозбужденном состоянии вращение двух частей молекулы вокруг двойной связи невозможно и такие молекулы имеют плоскую конфигурацию. При перекрывании *связывающих* -орбиталей молекула имеет наименьшую энергию. При возбуждении *-орбитали становятся разрыхляющими. При этом наименьшую энергию будет иметь конформация, при которой π -связь разрывается и две части молекулы поворачиваются вокруг σ -связи на 90°. Этот процесс имеет большое значение при фотохимических превращениях родопсина.

Об изменении дипольного момента мы уже говорили на одной из лекций (рис. 2).

Известно, что диссоциированная и не диссоциированная формы молекулы обладают различными спектрами поглощения и люминесценции. Как мы уже рассматривали высвечивание кванта люминесценции происходит из возбужденного (синглетного или триплетного) состояния, поэтому кривую диссоциации молекулы в возбужденном состоянии можно зарегистрировать люминесцентным методом. Если измерить спектры поглощения или люминесценции при различных pH, то можно определить кривые диссоциации. Эти кривые диссоциации будут отличаться друг от друга (рис. 3). Из рисунка видно, что для триптофана в области pH 9-10, т.е. там, где диссоциируют аминокислотные группы, отчетливо видна разница в величинах pK_{obs} основного и нижнего синглетного возбужденного состояний. А именно pK_{obs} , измеренное по поглощению, равно 9,8 тогда как $pK_{S_1^*}$, измеренное по флуоресценции, равно 9,1. Это означает, что аминокислотная группа триптофана в

i_5b9bb6b3453d6606

возбужденном состоянии обладает менее выраженными щелочными свойствами, чем в основном (рис. 4).

Как следует из формулы триптофана, диссоциирующая NH_3 -группа отделена от системы π -электронов, ответственных за поглощение и люминесценцию, двумя одинарными связями. Тем не менее возбуждение триптофана приводит к смещению электронной плотности к индольному кольцу и уменьшению энергии связывания протона с аминогруппой. Естественно, что более заметные изменения pK в возбужденном состоянии наблюдаются для групп, непосредственно связанных с ароматическими кольцами. Например, для α -нафтиламина $pK=4,1$; $pK_{S_1^*}=-2,0$. Значения $pK_{T_1^*}$ триплетного состояния значительно ближе к pK основного, чем $pK_{S_1^*}$ возбужденного синглетного состояния. Для α -нафтиламина $pK_{T_1^*}=3,3$. Эти результаты подчеркивают большие различия химической реакционной способности синглетных и триплетных состояний.

Изменение донорно-акцепторных свойств после поглощения фотона влияет на фотохимическое превращение молекулы. В возбужденной молекуле, как известно, высвобождается электронная вакансия на верхней заполненной орбитали, в результате чего молекула становится акцептором электрона, способным выступать в реакции фотовосстановления с подходящими донорами. Примером такой реакции может служить открытая А.А. Красновским (1948) реакция фотовосстановления хлорофилла. Это открытие имело фундаментальное значение в познании процесса фотосинтеза. Наряду с этим в возбужденной молекуле появляется электрон на сравнительно высоко расположенной нижней свободной орбитали. В

i_5b9bb6b3453d6606 47

результате этого молекула становится донором электрона и легко вступит в реакции фотоокисления. Так, ароматические аминокислоты способны отдавать электрон просто молекулам серы, то есть при поглощении ими в растворе кванта происходит фотоионизация.

Фотохимическое повреждение нуклеиновых кислот

Даунс и Блант (1877) обнаружили, что УФ-излучение инактивирует бактерии. В последующие годы число работ, посвященных биологическому действию ультрафиолета, росло в геометрической прогрессии, но механизмы, лежащие в основе процесса, оставались по-прежнему неясными. Историческими вехами стали два открытия, связанные с измерением спектров действия.

Ф.Л. Гейтс (1928) показал, что спектр действия гибели бактерий соответствует спектру поглощения нуклеиновых кислот. Л.Дж. Стадлер и Ф.М. Угер (1942) обнаружили, что спектр действия мутаций у кукурузы также совпадает со спектром поглощения нуклеиновых кислот. Таким образом, было выяснено, что основной мишенью при летальном и мутагенном действии ультрафиолетовых лучей служат нуклеиновые кислоты.

В нуклеиновых кислотах излучение в области 200-315 нм поглощается пуриновыми и пиримидиновыми азотистыми основаниями нуклеиновых кислот (рис. 5). За поглощение в основном ответственны π -электроны, в длинноволновой части спектра (280-315 нм) небольшой вклад вносят n - π -переходы с участием неподеленной пары электронов гетероатомов азота и кислорода. Гидролиз ДНК до смеси свободных нуклеотидов сопровождается

сдвигом полосы поглощения с 285 до 267 нм и одновременным увеличением оптической плотности на 70% (гиперхромный эффект). При денатурации двухспиральной ДНК наблюдаются аналогичные изменения, хотя они выражены меньше, чем при гидролизе: величина гиперхромного эффекта составляет 40%. Основания нуклеиновых кислот, а также ДНК и РНК при комнатных температурах и нейтральных рН имеют крайне низкие квантовые выходы флуоресценции (10^{-4}) и соответственно малые времена жизни синглетных возбужденных состояний (10^{-12} с). Выраженная люминесценция нуклеиновых кислот и оснований наблюдается только при крайних значениях рН, а также при низких температурах.

Под действием УФ-света происходит несколько фотохимических реакций повреждения нуклеиновых кислот. Следует отметить, что фотохимически наиболее лабильны пиримидиновые основания, значительно более стабильны пуриновые основания и углеводные остатки нуклеиновых кислот.

Известны три типа фотохимических превращений, которым подвергаются в основном пиримидиновые основания:

1. Димеризация.
2. Гидратация.
3. Сшивка с белками.

Наибольший прогресс в фотохимии нуклеиновых кислот начался в 60-е годы прошлого столетия, после того как Р.Бейкерс и В.Брендс открыли реакцию фотохимической димеризации тимина в ДНК. Вскоре было установлено, что димеризация Тимина играет существенную роль в

инактивации бактерий и вирусов.

Димеризация пиримидиновых оснований была впервые обнаружена в опытах на замороженных растворах тимина. Она заключается в ковалентном фотоприсоединении двух молекул с участием связей у 5-го и 6-го атомов углерода (рис. 7). При этом между основаниями образуется циклобутановое кольцо. 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 С скорость реакции не изменяется.

Интерес к этой реакции резко возрос после того как, была показана ее ведущая роль при повреждении ДНК. Например, на кишечной палочке было показано, что 50% инактивирующего действия ультрафиолета на трансформирующую ДНК можно отнести за счет димеризации тимина, а остальные 50% приходятся на долю всех остальных фотохимических реакций. Известно, что в двуспиральной ДНК в силу комплементарности оснований тимина никогда не могут быть расположены друг против друга. Поэтому расположение тиминных оснований рядом друг с другом возможно только при локальной денатурации ДНК – локальном расплетении комплементарных тяжей и сближении тиминных оснований. Фотохимическая димеризация закрепляет такую локальную денатурацию, то есть в ДНК появляется устойчивый структурный дефект.

Из облученных модельных соединений, например тимидил-тимидина, с помощью ТСХ выделены четыре типа димеров с циклобутановым кольцом – два *цис*- и два *транс*-изомера (рис. 8). Однако при облучении ДНК обнаруживается лишь один *цис*-изомер типа I. Показано, что под действием

коротковолнового света (например, при $\lambda = 235$ нм) димеры могут мономеризоваться. В отличие от спектра действия фотодимеризации ДНК спектр действия мономеризации располагается в более коротковолновой области (рис. 9). Из рисунка видно, что если облучение проводить в области длин волн более 280 нм. То будет преобладать процесс димеризации, а при облучении 240 нм – мономеризации. Также известно, что при длительном действии возбуждающего света устанавливается динамическое равновесие, при котором скорость прямой реакции равна скорости обратной реакции. Поэтому используя различные длины волн действующего света можно добиться различных стационарных концентраций тиминных димеров (рис. 10). На рисунке показано, что при длительном облучении политимидиновой кислоты 280 нм в димерную форму переходят 65% всех тиминов, а облучение того же образца при 240 нм приводит к установлению нового стационарного урона, когда 17% тиминов находятся в димерной форме. Поэтому применение «насыщающего» облучения 239 нм после 290 нм резко уменьшает концентрацию димеров в ДНК и политимидиновой кислоте. Изменение стационарного равновесия между димерной и мономерной формами в политимидиновой кислоте при переходе от длинноволнового к коротковолновому облучению можно представить также в виде схемы отображенной на рис. 11.

Известно, что предшественник фотодимеров тимина – первое триплетное состояние основания. Хотя есть предположения, что часть димеров может образовываться и синглетным путем.

Действие УФ-света на нуклеиновые кислоты

Тимидиновые димеры в настоящее время наиболее исследованы. Например, в соответствии с проведенными расчетами, условия для димеризации тимина в ДНК являются оптимальными, если соседние мономеры ориентированы друг к другу под углом в 36°. Тимидиновым димерам принадлежит ведущая роль в УФ-повреждении ДНК. С меньшей вероятностью могут образовываться димеры типа Ц-Ц или Т-Ц, то есть димер цитозина и тимин-цитозинный димер – димер смешанного типа. Считают, что димеры пиримидиновых оснований, образующиеся в одной цепи ДНК, составляют 70-80 % от всех летальных повреждений, индуцируемых коротковолновым УФ-светом.

Вследствие высокой лабильности цитозинных димеров их пространственную структуру установить до сих пор не удалось. Димеры цитозина очень неустойчивы и в темноте могут мономеризоваться или дезаминироваться, превращаясь в урациловые димеры.

Тимин-цитозинный, тимин-урациловый и урацил-цитозинный смешанные димеры образуются при облучении растворов нуклеотидов и ДНК. При этом смешанный тимин-цитозинный 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 объясняется тем, что цитозин в составе смешанного димера дезаминируется до урацила.

В молекулах РНК, где присутствует урацил, может происходить

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 (рис. 11).

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.

Фотоприсоединение оснований идет в 6-4 положении. По сравнению с пиримидиновыми димерами количество аддуктов, возникающих при УФ-облучении, невелико. Аддукты возникают, по-видимому, не через триплетное, а через синглетное состояние. В экспериментах показано, что внесение доноров триплетного состояния тимина не способствует их образованию. Квантовый выход (6-4) аддуктов приблизительно в 10 раз меньше, чем циклобутановых димеров, и следовательно, в летальный эффект УФ-излучения они вносят незначительный вклад. Однако в УФ-мутагенезе они могут играть важную роль. В отличие от летальных повреждений ДНК, мутационные дефекты возникают намного реже, и поэтому для них требование максимального квантового выхода не имеет принципиального значения.

Другой важной реакцией фотоповреждения нуклеиновых кислот является фотогидратация пиримидиновых оснований. В результате

фотогидратации цитозина и урацила образуются 6-окси-5-гидропроизводные. То есть, реакция фотогидратации сводится к присоединению воды у 5 и 6 атомов пиримидинового кольца. При этом, естественно, происходит разрыв двойной связи.

Накопление гидратов было продемонстрировано в растворах свободных цитозина и урацила, а также в РНК и однострессовой ДНК, тогда как в двустрессовой ДНК они не обнаруживаются. Предполагается, что фотогидратация идет через синглетное состояние, так как тушители триплетных состояний (например, кислород) не влияют на скорость фотогидратации. Кроме того, применение триплетных фотосенсибилизаторов, избирательно переводящих пиримидиновые основания в триплетное состояние, не приводит к стимуляции фотогидратации. Еще одним доказательством того, что предшественниками фотогидратов служат синглетные возбужденные состояния пиримидиновых оснований, является независимость квантового выхода реакции от длины волны. Тогда как вероятность конверсии в триплетное состояние зависит от длины волны света.

В отличие от реакции димеризации фотогидратация необратима. Под действием света не удастся вызвать регенерацию с образованием исходных пиримидиновых оснований. Если длительно подвергать воздействию ультрафиолета, например, полиуридилловую кислоту, то в растворе обнаруживаются практически только гидраты. В отсутствие света гидраты могут разрушаться при изменении внешних условий: при повышении температуры, при изменении рН в кислую или щелочную сторону, при

i_5b9bb6b3453d6606

повышении ионной силы раствора.

Особенностью реакции фотогидратации заключается в том, что она протекает в ДНК только на одноцепочечном участке молекулы. Поэтому гидраты пиримидинов могут вносить вклад в летальный или мутагенный эффект лишь у клеток с активными процессами репликации и транскрипции, в ходе которых появляются короткие одноцепочечные участки ДНК.

Еще один – третий типа фотохимических превращений, которым подвергаются нуклеиновые кислоты – это сшивка с белками. Первое предположение на образование таких сшивок высказал К. Смит. Он обнаружил, что ДНК хуже экстрагируется из кишечных палочек, если перед этим они облучались ультрафиолетовым светом. После гидролиза белков протеолитическими ферментами экстрагируемость ДНК восстанавливалась. Эта реакция была воспроизведена в растворе с использованием бычьего сывороточного альбумина в смеси с ДНК. Показано, что при облучении смесей цитозина или урацила с такими аминокислотами как: серин, цистин, метионин, лизин, аргинин, гистидин, триптофан, тирозин и фенилаланин происходит взаимодействие. Аминокислоты могут ковалентно присоединяться к пиримидиновым основаниям в 5 или 6 положении. В 1966 г Смитом впервые выделен и идентифицирован 5-S-цистеин-6-гидроурацил. Показано, что акцепторами УФ-света являются оба компонента, поскольку облучение как белка, так и ДНК перед смешиванием сопровождается образованием сшивок. На основании этого непосредственными предшественниками сшивок считают некие долгоживущие продукты, возможно свободнорадикальной природы.

Итак, мы с вами рассмотрели фотохимические превращения в нуклеиновых кислотах и их комплексах. Согласно общепринятому мнению, ДНК – основная внутриклеточная мишень при летальном и коротковолновом УФ – излучении. Рассмотренные выше фотохимические реакции протекают с участием низших возбужденных (синглетных или триплетных) состояний. Такие состояния возникают при поглощении основаниями, в основном пиримидиновыми, одного кванта ультрафиолетового света. Вместе с тем при определенных условиях, основания нуклеиновых кислот могут вступать в фотохимические реакции и при поглощении двух квантов света.

В отличие от света, испускаемого обычным некогерентным источником, лазерное излучение обладает такими свойствами, как пространственная когерентность, монохроматичность, высокая интенсивность и концентрация энергии в коротком импульсе наносекундной или пикосекундной длительности. В частности, большая мощность и ультракороткое время действия делают лазерное УФ-излучение потенциально новым инструментом для исследования процессов двухквантового возбуждения электронных уровней оснований ДНК. А также удобным инструментом для исследования протекающих при этом фотохимических реакций и их проявления на биологическом уровне.

При облучении лазером оснований возрастает заселенность возбужденных S_1 и T_1 уровней, а также скорость их опустошения в результате перехода наверх. Таким образом, реализуется возбуждение высоколежащих S_n и T_n уровней. Такое двухквантовое возбуждение через промежуточную ступень - S_1 и T_1 состояние называется двухступенчатым. Экспериментальные

i_5b9bb6b3453d6606

исследования показали, что при высоких интенсивностях света происходят необратимые фотохимические изменения молекул. Причем, показано, что образующиеся продукты качественно отличаются от фотопродуктов одноквантовых реакций, таких как пиримидиновые димеры или гидраты. При этом степень деградации оснований квадратично зависит от интенсивности излучения. По сходству проанализированных продуктов лазерного фотолиза с продуктами гамма-радиолиза ДНК предполагается, что при лазерном УФ-облучении происходит фотоионизация оснований.

Лазер-индуцированное двухквантовое возбуждение оснований в составе ДНК приводит к таким ее фотохимическим превращениям, которые не наблюдаются (либо идут с очень низким квантовым выходом) в случае действия низкоинтенсивного УФ-света. Наряду с деградацией оснований в ДНК выявлены разрывы N-гликозидной связи с отрывом тимина от цепи ДНК (при низкоинтенсивном УФ-облучении такой процесс не происходит) и одноцепочечные разрывы.

Действие ультрафиолетового света на белки

Наряду с нуклеиновыми кислотами белки относятся к одним из основных акцепторов биологически активного ультрафиолетового света в клетке. При этом деструктивно-модифицирующее действие УФ-света связано с фотохимическими повреждениями белковой макромолекулы. Поглощение пептидных связей имеет максимум в области 180-190 нм, который уменьшается почти до нуля к 240 нм. Остатки цистина и цистеина в молекулах белка дают монотонно возрастающую от 300 нм в коротковолновую область полосу поглощения. Наиболее значительным поглощением обладают ароматические аминокислоты триптофан, тирозин и фенилаланин, имеющие длинноволновые максимумы соответственно около 285, 280 и 258 нм, хвост поглощения простирается примерно до 310 нм.

При действии солнечного УФ-света, имеющего коротковолновую границу около 285 нм, наибольший вклад в фотоповреждение белков дают ароматические аминокислоты триптофан и тирозин.

Имеющиеся хромофорные группы белка можно разделить на существенные и несущественные для сохранения активности фермента. Некоторые аминокислотные остатки могут располагаться далеко от активного центра фермента и их разрушение не приводит к изменению конформации белка и изменению активности. С другой стороны, энергия фотонов, поглощенных одним остатком, может переноситься на другие остатки аминокислот. При поглощении фотонов остатками аминокислот, они переходят в электронно-возбужденное состояние. Затем происходит отрыв электрона (фотоионизация) с образованием свободных радикалов: катион-

радикала аминокислоты и сольватированного электрона:



Сольватированным (от английского solvent – растворитель) называют электрон, находящийся в комплексе с молекулами растворителя. Катион-радикал – сильная кислота, и он быстро диссоциирует на протон и нейтральный свободный радикал. То есть в итоге происходит отрыв атома водорода:



Нейтральные свободные радикалы очень неустойчивые соединения и вступают в дальнейшие превращения. При этом может происходить модификация не только самих аминокислотных остатков триптофана, тирозина и фенилаланина, поглотивших свет, но и других, находящихся рядом молекул. Белки могут повышать чувствительность к свету или фотосенсибилизировать другие молекулы. Белки инициируют или способствуют химическим изменениям других молекул. Фотосенсибилизационные реакции также могут протекать с участием сольватированного электрона. Большим сродством к электрону обладают серосодержащие аминокислоты – цистин и цистеин. Они быстро разрушаются в результате взаимодействия с сольватированными электронами, выбитыми из ароматических аминокислот. Сольватированный электрон может захватываться молекулярным кислородом с появлением супероксидного анионрадикала – одной из активных форм кислорода.

Свободные радикалы, АФК и их образование

Итак, рассмотрим подробнее, что из себя представляют свободные

радикалы.

Все стабильные молекулы на каждом электронном энергетическом уровне имеют по два электрона с противоположно направленными спинами. В определенных условиях может происходить либо отрыв одного электрона, либо присоединение одного электрона к молекуле. Свободным радикалом называется молекула или ее часть, имеющая неспаренный электрон.

Свободный радикал обозначают жирной точкой над соответствующей группой химического соединения или над условным обозначением этого вещества, например нейтральный радикал тирозина –

Супероксидный анионрадикал – O_2^-

Катион радикал тирозина –

Радикалы условно можно разделить на две большие группы: активные и стабильные. В стабильных радикалах электрон делокализуется (распределяется) по молекуле. Не менее существенным фактором, влияющим на стабильность радикала, является пространственный фактор - наличие групп, прикрывающих реакционный центр с неспаренным электроном. Активные радикалы, в отличие от стабильных, чрезвычайно высоко реакционноспособны.

Почему это происходит? С точки зрения химии появление неспаренного электрона есть не что иное, как появление у молекулы свободной валентности; такие молекулы легко вступают в химические реакции, поэтому для свободных (активных) радикалов и характерна высокая

реакционная способность. Другими их особенностями являются парамагнетизм (так как они имеют нескомпенсированные магнитные моменты неспаренных электронов) и способность вести цепные реакции.

Цепные реакции являются одними из характерных реакций активных радикалов. Стабилизируясь путем отрыва какого-либо атома от растворителя или первой попавшейся молекулы, радикал порождает образование нового радикала из молекулы, с которой он столкнулся. Все повторяется до тех пор, пока цепь не оборвется за счет сдваивания одноименных (димеризация) или разноименных (рекомбинация) радикалов.

В биологических системах различают несколько типов свободных радикалов:

1. Свободные радикалы кислорода или по-другому активные формы кислорода (АФК).
2. Свободные радикалы органических молекул, образующиеся при действии ионизирующей и УФ-радиации
3. Свободные радикалы хинонов
4. Свободные радикалы липидов

Кислород добро и зло образование АФК

Рассмотрим подробнее, какую же роль играет кислород в живых системах, и как происходит образование активных его форм.

Кислород играет ключевую роль в энергетике большинства живых существ. Он служит окислителем питательных веществ при дыхании животных, растений, грибов и бактерий. Энергия, получаемая в процессе дыхания, запасается, в основном, в форме аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), которая, в свою очередь, тратит энергию на все нужды клетки. Без кислорода обходятся лишь сравнительно немногочисленные виды, обитающие в бескислородных (анаэробных) условиях и покрывающие свои энергетические потребности за счет брожения. Метаболические процессы, жизненно необходимые для клетки, также протекают с поглощением кислорода. При этом их итогом оказывается образование тех или иных полезных соединений. Например, синтез стероидных гормонов в коре надпочечника. У млекопитающих удалению из организма токсических соединений обычно предшествует их окисление кислородом с образованием продуктов, которые лучше растворимы в воде и потому могут быть быстрее выделены из организма через почки. Предполагается, что у растений детоксикация некоторых ксенобиотиков также происходит при участии кислорода, а именно его активной формы – супероксидного анионрадикала. Помимо детоксикации ксенобиотиков, при непосредственном участии процесса дыхания происходит удаление молочной кислоты, конечного продукта бескислородного (анаэробного) метаболизма млекопитающих.

Одним из парадоксов жизни на нашей планете является то, что

кислород - молекула, поддерживающая всю аэробную жизнь и служащая основой для энергетического метаболизма и дыхания, вовлечена во многие дегенеративные процессы и болезни. Высокая окислительная способность кислорода, необходимая для его функционирования в дыхательной системе, из добра превращается в зло, если принять во внимание возможность "паразитных" химических реакций окисления кислородом различных химических веществ в живой клетке. Клетка "стремится" поддерживать концентрацию кислорода на минимальном уровне. Одним из механизмов, обеспечивающих эту функцию, является дыхание. Потребление кислорода дыхательными ферментами снижает количество кислорода в митохондриях и клетке в целом, тем самым, предотвращая его нежелательное действие как неспецифического окислителя многих клеточных компонентов. Проблема защиты от кислорода у растений стоит особенно остро, так как они не только потребляют кислород, но и, осуществляя фотосинтез, постоянно подвергаются действию представляющего опасность светового излучения и существуют при высоких концентрациях молекулярного кислорода, выделяя его в результате фотоокисления воды в хлоропластах.

Важно, что клетка обладает значительным арсеналом средств, которые контролируют образование всех АФК и обеспечивают защиту от них. Но, несмотря на все механизмы защиты, определенное количество АФК всегда присутствует в клетке. Возникает вопрос: "Неужели на всем протяжении эволюции в живых системах не было создано достаточно плодотворного механизма, полностью предотвращающего образование АФК, которые обладают необычайно высокой "агрессивностью" и способны повреждать

i_5b9bb6b3453d6606

практически все компоненты клетки, включая белки, ферменты, ДНК и мембранные структуры?" Возможно, разгадка кроется в другом. В последнее время получены указания на то, что некоторые из АФК выполняют определенные функции в организме и в некоторых случаях выступают в качестве сигнальных молекул. Высказывается также предположение, что пероксисомальное окисление, и в частности АФК, генерируемые и утилизируемые микротельцами (пероксисомами), играет ключевую роль в метаболизме растительной клетки, объединяя потоки метаболитов в целостную систему. Окисление ДНК под воздействием АФК представляет собой важнейший инструмент природного мутагенеза. Таким образом, по мнению Скулачева, поддерживая частоту мутаций на определенном уровне, клетка могла бы обеспечить некий гарантированный уровень изменчивости, необходимый для эволюционного прогресса. Автор предполагает, что на биохимическом уровне кислород, именно активные его формы, мог играть ведущую роль в переключении r- и K-стратегий жизнедеятельности, ускоряя биологическую эволюцию. Суть этого процесса заключается в следующем: в ответ на ухудшение условий в популяции появляются более мощные, активнее дышащие и размножающиеся особи с уменьшенным сроком жизни (r-стратегия). Появление в процессе естественного отбора более приспособленных к новым условиям организмов снижает их активность, скорость дыхания, темп размножения и увеличивает продолжительность жизни (K-стратегия). Возможно, в ходе эволюции кислород также играл важную роль в формировании новых биохимических путей, обуславливая окисление субстратов, которые в результате этого могли вступать в

дальнейшие пути превращений.

В биологической литературе, посвященной изучению окислительных повреждающих реакций, долгое время оставалось неясным, в каких именно реакциях образуются и что представляют собой первичные свободные радикалы. Теперь становится все более очевидным, что ими чаще всего являются свободные радикалы молекулярного кислорода, и в первую очередь O_2 . Кроме полного четырехэлектронного восстановления молекулы O_2 до воды в дыхательной цепи митохондрий, в аэробных клетках всегда происходит и неполное - одно- трехэлектронное восстановление (рис.) с последовательным образованием различных АФК.

Как видно из рисунка наиболее общее биологическое образование восстановленного кислорода происходит благодаря передаче одиночных электронов (одноэлектронному переносу). Окислительно-восстановительный потенциал пары O_2/O_2 расположен в отрицательной области (около $-0,2$ В), а кинетические барьеры реакций одноэлектронного восстановления O_2 веществами клетки достаточно велики, поэтому само по себе образование O_2 в клетке - процесс медленный, но довольно опасный. Известно, что около 98 % кислорода, потребляемого митохондриями для дыхания, превращается в воду, в то время как оставшиеся 2 % дают супероксидный анионрадикал, в основном за счет "паразитных" химических реакций, происходящих в начале и середине цепи дыхательных ферментов митохондрий. При этом донорами электрона служат Fe^{2+} , Cu, семихиноны и некоторые другие промежуточные продукты дыхания. O_2 имеет редокс потенциал 0,33 В и обладает как окислительными, так и восстановительными свойствами. Этот радикал

i_5b9bb6b3453d6606

непосредственно не является тем агентом, который обуславливает окислительные процессы в биологических субстратах и мембранах, и инициирование свободнорадикальных состояний обычно связывают с другими АФК, возникающими вслед за O_2 . Из продуктов первичного восстановления O_2 или его протонированной формы (при слабнокислых значениях pH) - гидроперекисного радикала при последующем получении еще одного электрона образуется H_2O_2 (Рис. 1). Перекись водорода образуется также в результате взаимодействия (дисмутации) двух молекул O_2 :



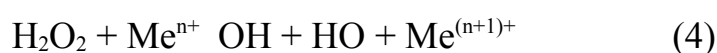
При дальнейшем одноэлектронном восстановлении возможно появление гидроксильного радикала (НО), который является необыкновенно сильным окислителем, разрушающем любые вещества живой клетки. Гидроксильный радикал может образовываться при взаимодействии перекиси водорода с супероксид-ионом:



хотя в обычных условиях он образуется достаточно слабо. Усиливающее действие на течение реакции оказывают ионы металлов переменной валентности, в частности меди и железа:



Данная реакция происходит только в присутствии ионов металлов и носит название реакции Хабера-Вайса (Haber-Weiss). Ионы металлов (Me^{n+}) переменной валентности могут взаимодействовать непосредственно с перекисью водорода по реакции Фентона (Fenton):



Ревосстановление металла осуществляется преимущественно супероксид-ионом. Природа агента, инициирующего окислительные реакции, до сих пор остается неясной, и не во всех ситуациях доказана роль НО, возникающего в реакциях Фентона и Хабера-Вайса. В этой связи предполагают участие комплексов металлов переменной валентности с кислородом.

Среди АФК важное место принадлежит синглетному кислороду ($^1\text{O}_2$). $^1\text{O}_2$ может возникать в клетке при нормальном функционировании ряда ферментов и биохимических систем. Основной путь его возникновения обусловлен световыми реакциями, которые опосредованы пигментами-фотосенсибилизаторами. Поглощая квант света, пигмент-фотосенсибилизатор переходит в синглетное и затем в триплетное возбужденные состояния. Взаимодействуя с молекулярным O_2 , возбужденные пигменты передают на него свою энергию с образованием $^1\text{O}_2$. Фотосенсибилизаторы могут также взаимодействовать с O_2 с последующим образованием НО.

Еще одним важным радикальным соединением является оксид азота NO, образуемый NO-синтазой клетки. Этот фермент обнаруживается в фагоцитах, нейронах и гладкомышечных клетках кровеносных сосудов животных, в пероксисомах растительных клеток. Оксид азота рассматривают как сигнальную молекулу – вторичный мессенджер. Оксид азота может взаимодействовать с супероксид-ионом с образованием еще одного токсичного радикала пероксинитрита (ONOO). Пероксинитрит отличается высокой реакционной способностью, он способен разрушать клеточные структуры и вызывать смерть клеток.

Образование свободных радикалов и АФК связано как с неферментативными (например, окислительно-восстановительные реакции фенолов, хинонов, флавинов, автоокисление гем- и SH-содержащих соединений), так и с ферментативными процессами. Свободные радикалы являются высокорекреационноспособными, быстро превращающимися друг в друга веществами. Их появление сигнализирует о "необходимости" изменения метаболизма клетки. Патологические последствия возникают при чрезмерном накоплении АФК, пероксидов и их вторичных продуктов – состоянии, называемом обычно оксидативным стрессом, а факторы и вещества, способствующие этому, называют прооксидантами. Например, на следующем рисунке представлены места образования АФК в различных структурах растительной клетки (рис. 3).

Токсическое действие АФК. Окислительное повреждение макромолекул

Органические гидропероксиды ROOH образуются в реакции органических веществ с обычным молекулярным кислородом при участии ферментов диоксигеназ или циклооксигеназ:



ROOH по своей структуре подобны H₂O₂ (R-O-O-R и H-O-O-H) и химически тоже активны, при последующем метаболизме они переходят в спирты, альдегиды, эпоксиды и другие окисленные соединения. Образование ROOH называют перекисным окислением. Основы теории перекисного окисления (названной впоследствии теорией Баха-Энглера) были заложены еще в начале XX века А.Н. Бахом. Уже в этот период А.Н. Бах писал:

i_5b9bb6b3453d6606

"Образование перекисей в качестве неизбежной фазы окисления свободным кислородом принадлежит к числу постоянных факторов, которые, как свет, теплота и т.д., играют определенную роль в жизни клетки и к которым живая клетка должна определенным образом приспособливаться. Это приспособление к перекисям происходит таким образом, что клетка создает ферменты, посредством которых образование перекисей может быть использовано, а в случае необходимости - сделано безвредным". Теория Баха-Энглера сыграла большую роль в становлении представлений о биологическом окислении, и ее важные положения, касающиеся активирования кислорода, получили развитие позднее в химии свободных радикалов. Во-многом, становление представлений о роли свободнорадикальных состояний в биохимических процессах связано с разработкой в 30-х годах школой Н.Н. Семенова общей теории жидкофазного окисления. В своих классических трудах Михаэлис полагал, что окислительные реакции органических молекул протекают через последовательные одноэлектронные стадии. В настоящее время справедливость этого утверждения экспериментально подтверждена для целого ряда ферментативных и электронно-транспортных систем. В клетках живых организмов могут протекать реакции, в известной степени аналогичные цепному свободно-радикальному окислению.

Перекисное окисление липидов

Несмотря на свою короткую продолжительность жизни, АФК проявляют высокую цитотоксичность. O_2 – небольшая хорошо растворимая

нейтральная молекула, лучше растворимая в жире (в системе жир/вода кислорода примерно в 10 раз больше в жире). В отличие от молекулярного кислорода, для которого биологические мембраны не представляют преграды для проникновения, O_2 заряжен, а стало быть, гидратирован и не может пройти сквозь гидрофобный мембранный барьер. Более того, клетка, окруженная мембраной, становится ловушкой для O_2 . Известно, что мембраны, как естественный барьер, первыми подвергаются действию стрессовых факторов. Таким образом, мембранные структуры становятся мишенью поражающего действия АФК. Наиболее уязвимыми являются жирнокислотные цепи мембранных фосфолипидов, содержащих сопряженные двойные связи (Рис. 4).

Под воздействием свободных радикалов происходит перекисное окисление липидов, сопровождаемое нарушениями свойств биологических мембран и функционирования клеток. АФК вызывают в липидах (L) цепные реакции с накоплением липидных радикалов L, пероксидов LOO, гидропероксидов LOOH и алкоксидов LO. Существенное ускорение пероксидации липидов наблюдается в присутствии небольших количеств ионов двухвалентного железа. Владимиров Ю.А. приводит три прямых следствия перекисного окисления липидов. Первый результат - окисление тиоловых (сульфгидрильных) групп мембранных белков. Второй результат – непосредственное увеличение ионной проницаемости липидного слоя. Третий результат – уменьшение стабильности липидного бислоя, что может привести к электрическому пробое мембраны под действием разности потенциалов, которую сама мембрана и создает. Более того, продукты

i_5b9bb6b3453d6606

перекисного окисления липидов (4-гидроксиалкинали, малоновый диальдегид и др.) являются мутагенными и цитотоксичными соединениями.

Окислительное повреждение нуклеиновых кислот

Кроме перекисного окисления липидов, следует отметить и другие не менее важные механизмы повреждающего действия АФК. Они вызывают оксидативную модификацию белков, нуклеотидов и нуклеиновых кислот, особенно ДНК, что приводит к образованию гидропероксидов ROOH. Как известно, дыхательные ферменты локализованы во внутренней мембране митохондрий. Митохондриальная ДНК, находящаяся в матриксе митохондрий, по-видимому, является наиболее уязвимой мишенью для активных производных кислорода, генерируемых дыхательными ферментами. Окислительное повреждение митохондриальной ДНК играет ключевую роль в целом ряде "митохондриальных болезней", а также в процессе старения. Воздействие АФК на ядерную ДНК может приводить к окислению оснований и потенциальным мутационным изменениям, к разрыву нитей ДНК, а также к другим повреждениям ДНК, хромосом. При этом считают, что АФК вызывают больше мутаций, чем другой класс мутагенов – алкилирующие вещества. Мутации могут привести к патологии и гибели клеток или их злокачественному перерождению (раки, лейкозы и др.), а мутации в ДНК половых клеток – к наследуемым заболеваниям. Высокие концентрации АФК и липидных гидропероксидов ингибируют синтез ДНК и деление клеток и могут активировать апоптоз –

i_5b9bb6b3453d6606 71

запрограммированную смерть клеток.

Окислительное повреждение белков

Вследствие тесного взаимодействия липидных и белковых компонентов в мембранах, изменения в свойствах липидов должны неизбежно влиять и на функции мембранных белков. Так, например, связанное с перекисным окислением липидов окисление белков и образование белковых агрегатов в хрусталике глаза заканчиваются его помутнением. Этот процесс играет важную роль в развитии старческой и других видов катаракты у человека. Особенно восприимчивыми участками к окислительному повреждению являются серосодержащие аминокислоты и тиоловые группы (-SH). Активный кислород может окислять эти группы в тиоловые радикалы, которые впоследствии соединяются с другими тиоловыми радикалами с образованием дисульфидных мостиков (-SS-), либо может образоваться связь с метионином – метионин-сульфоксид производные. Многие ферменты, содержащие SH-группы, такие, как АТФазы или дегидрогеназы, легко окисляются АФК. Например, при таком окислении происходит превращение ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу. Превращение –SH в -SS- может быть обратимым, на этом и основано изменение проницаемости ионных каналов в плазматической мембране клеток. Белок метионин-S-оксидоредуктаза была описана для хлоропластов гороха. Этот фермент окисляет метионин сульфоксид обратно в метионин в присутствии тиоредоксина. Получены экспериментальные доказательства формирования канальных кластеров при –SH–/–SS– переходах мембранных белков и

i_5b9bb6b3453d6606

увеличения проницаемости мембран для K^+ и Ca^{2+} . Окисление белков может также быть и необратимым. Например, нарушение ферментативной функции энзимов происходит из-за окисления железо-серных центров многих протеинов.

Многие аминокислоты претерпевают необратимые изменения при окислении белка. На доступность аминокислот влияет первичная, вторичная и третичная структуры белков. Сами аминокислоты в полипептидах отличаются по своей чувствительности к АФК. Например, триптофан поперечными сшивками (связями) образует битирозиновые продукты. Гистидин, лизин, пролин, аргинин и серин при окислении образуют карбонильные группы. Окислительная атака белков приводит к изменениям в аминокислотных участках, разрушению полипептидных цепочек и агрегации продуктов реакции, что приводит к протеолизу полипептидов, нарушению третичной структуры и даже денатурации. В результате реакции Фентона окислительное повреждение белка может увеличиваться в присутствии кофакторов – металлов переменной валентности, при этом гидроксильный радикал быстро окисляет аминокислотные остатки, находящиеся рядом с активным центром фермента. Это в дальнейшем приводит к разрушению активного центра и коагуляции протеина, а в последствии к протеолизу. В *E. coli* существуют даже специфические протеазы, которые лизируют окисленный белок. В результате оксидативной модификации белков может происходить аутооксидативное гликозилирование белков.

Нетоксическая роль АФК

На протяжении длительного времени в биологической и особенно в медицинской литературе основной акцент делали на токсических эффектах АФК и оксидативной модификации макромолекул. Они действительно существуют, но теперь уже нет сомнений, что образование АФК и оксидативная модификация играют также и положительную роль.

Свободные радикалы играют ключевую роль как во вредных, так и полезных эффектах созревания и старения различных растительных органов: листьев, цветов, плодов. Многие данные свидетельствуют, что изменения в стареющих тканях связаны с модификацией свойств мембран. Клеточная мембрана позволяет клетке поддерживать внутриклеточный состав, избирательно аккумулировать нужные соединения и активно выбрасывать конечные продукты обмена веществ. Стабильность мембранного бислоя существенно зависит от состава и соотношения составляющих его липидов. Как известно, липоксигеназа, осуществляющая окисгенирование двойной связи жирных кислот, является одним из ферментов, участвующих в деградации липидов. Показано, что в процессе старения происходит значительное увеличение активности липоксигеназы. Опосредованные липоксигеназой окислительные реакции при старении растений могут определяться не столько активностью этого фермента, но в большей мере доступностью субстрата. Накопление окисленных липидов и возникающих из них продуктов, по-видимому, является одной из причин дестабилизации структуры бислоя и нарушений мембранных функций при старении растений. Один из фитогормонов этилен рассматривают как вещество, усиливающее разрушение липидов и интенсивность свободнорадикального

i_5b9bb6b3453d6606

окисления, как триггер старения, или фактор, интегрирующий метаболические процессы при старении. С другой стороны, биогенез этилена связан со свободнорадикальными процессами. Согласно экспериментам, проведенным на срезах тканей, гомогенатах и изолированных мембранных структурах, синтез этилена зависит от присутствия кислорода и подавляется перехватчиками свободных радикалов, а также каталазой и супероксиддисмутазой. Предполагается, что ключевое значение при старении имеет тонко сбалансированное равновесие между катаболизмом и реконструкцией мембранных фосфолипидов. Согласно этим представлениям, катаболический цикл запускают ионы Ca^{2+} , которые связываясь с кальмодулином, активируют фосфолипазу A_2 , обеспечивающую субстратом (свободными жирными кислотами) липоксигеназу. В липоксигеназной реакции под действием АФК образуются этилен, эндогенные ионофоры кальция, малоновый диальдегид и жасмоновая кислота. В свою очередь, эти события вызывают поступление в клетку дополнительных количеств Ca^{2+} , что замыкает цикл. Параллельно этому протекает обратный процесс реконструкции, возможно, что направление путей метаболизма опосредовано фитогормонами при участии фосфоинозитидов.

В результате оксидативной модификации липидов, происходящей при участии АФК, в клетках животных могут синтезироваться эйкозаноиды (производные оксигенированных C_{20} -полиеновых жирных кислот). Эти соединения относятся к классу так называемых "внутриклеточных гормонов" и обладают высокой биологической активностью. Они защищают от повреждений клетки желудка, сердца и других органов, способствуют

развитию полезной защитной реакции – первичному воспалению, вызывать хемотаксис и активацию нейтрофилов. Для мозга человека характерен повышенный синтез простагландинов, тромбоксанов и лейкотриенов, требующий участия O_2 , а также арахидоновой кислоты – соединения, высвобождающегося из мембранных фосфолипидов в результате перекисного окисления липидов и последующего активирования фосфолипазы A_2 .

Серьезной проблемой для многоклеточных организмов является борьба с клетками-врагами. У животных важную роль в этом играют фагоциты (нейтрофилы и макрофаги), которые захватывают микроорганизмы, а затем убивают их, используя АФК в качестве основного оружия, повреждающего патогены. Макрофаги мигрируют в очаг воспаления, где они активируются и с помощью специальной оксидазы генерируют из O_2 супероксид-ион, а затем гидропероксид (с помощью СОД) и гипохлорит (в результате миелопероксидазной реакции), создавая условия для ликвидации инфекции. В ответ на вторжение патогена в растительных клетках также развивается окислительный взрыв – быстрая и скоротечная продукция больших количеств АФК.

Усиленная активация кислорода в ответ на заражение наблюдается у разных видов растений и при разных по природе инфекционных процессах (грибных, бактериальных, вирусных болезнях, поражениях нематодой). Ряд физических и химических факторов, не нанося прямого ущерба возбудителю болезни, могут повышать болезнеустойчивость растений, вероятно, путем усиления генерации в них АФК.

Одной из защитных функций организма является детоксикация

ксенобиотиков. Было показано, что в клетках корней пшеницы (*Triticum aestivum* L.) происходит детоксикация амидопирина с образованием конечного продукта его деметилирования формальдегида. Начальным этапом детоксикации некоторых ксенобиотиков (например, замещенных аминов) является образование N-окисей (рис. 4) при участии супероксида, образующегося флавиновым ферментом. Таким способом может обезвреживаться диметиланилин, или амидопирин.

Ряд исследователей указывает на регуляторные функции активированного кислорода. У млекопитающих АФК способны модулировать активности двух глобальных транскрипционных факторов – AP-1 и NF-kB, что приводит к индукции многих белков. В организме человека H_2O_2 накапливается при инвазии вирусов и бактерий и активирует транскрипционный фактор NF-kB, что приводит к индукции ряда цитокинов и иммунных рецепторов, индукции белков острой фазы и адгезии (последние способствуют выходу лейкоцитов в ткани, что важно при воспалении). Рассматривается участие кислородных радикалов в процессах пролиферации клеток и регенерации тканей. Известно, что АФК стимулируют дифференцировку, причем дифференцировке предшествует остановка деления. Возможно, что такое воздействие связано с укорочением теломерной ДНК. Активированный кислород стимулирует накопление в клетке вторичных посредников: цАМФ и цГМФ, Ca^{2+} , которые стимулируют фосфорилирование белков в результате активации протеинкиназ и ингибирования протеинфосфатаз; активируют белок Ras, играющий важную роль в передаче сигналов в ядро клетки. АФК могут ускорять процесс

i_5b9bb6b3453d6606

эмбриогенеза, влияя на репликативную ДНК-полимеразу. В растениях O_2 , H_2O_2 , NO являются вторичными посредниками NADPH-оксидазной (супероксидсинтазной) и NO-синтазной сигнальных систем. АФК и липидные ROOH в низких субтоксических концентрациях индуцируют такие процессы, как экспрессию генов (в том числе генов раннего ответа и других протоонкогенов) и деление клеток. Показано, что образование O_2 необходимо для развития этиолированных проростков пшеницы. Сопровождающие ранний онтогенез периодические циклы образования O_2 участвуют в реализации программы онтогенеза, включая рост растяжением клеток и апоптоз. Предполагается, что супероксид является вторичным посредником клеточной активации и пролиферации. По-видимому, в клетках растений существует достаточно скоординированная сигнальная сеть, в которой активация одних сигнальных систем, вызванная взаимодействием сигналов со "своими" рецепторами, может "подготовить" (с помощью характерных для них вторичных посредников) другие сигнальные системы – перевести их в состояние повышенной восприимчивости к этим сигналам или, наоборот, пониженной восприимчивости.

Действие ультрафиолетового света на макромолекулы

На прошлой лекции мы проанализировали как образуются активные формы кислорода. Какой вред они приносят, и каков их положительный эффект. Мы с вами продолжаем рассматривать действие ультрафиолетового света на макромолекулы.

При поглощении фотонов остатками аминокислот, они переходят в

электронно-возбужденное состояние. Затем происходит отрыв электрона (фотоионизация) с образованием свободных радикалов: катион-радикала аминокислоты и сольватированного электрона:



Сольватированным (от английского solvent – растворитель) называют электрон, находящийся в комплексе с молекулами растворителя.

Катион-радикал – сильная кислота, и он быстро диссоциирует на протон и нейтральный свободный радикал. То есть в итоге происходит отрыв атома водорода:



Нейтральные свободные радикалы очень неустойчивые соединения и вступают в дальнейшие превращения. При этом может происходить модификация не только самих аминокислотных остатков триптофана, тирозина и фенилаланина, поглотивших свет, но и других, находящихся рядом молекул. Таким образом, образующийся в белках катион-радикал, диссоциируя на протон и нейтральный радикал, может взаимодействовать с соседними группами полипептидной цепи, образуя межмолекулярную ковалентную сшивку – стабильный фотопродукт.

Белки могут повышать чувствительность к свету или фотосенсибилизировать другие молекулы. Белки инициируют или способствуют химическим изменениям других молекул. В присутствии кислорода может происходить фотоокисление ароматических аминокислот. Процесс протекает через стадию образования пероксидных продуктов.

Кроме того, фотосенсибилизационные реакции также могут протекать с

участием сольватированного электрона. Такой электрон является частицей с очень высокой реакционной способностью и может вступать в химические реакции. Большим сродством к электрону обладают серосодержащие аминокислоты – цистин и цистеин. Они быстро разрушаются в результате взаимодействия с сольватированными электронами, выбитыми из ароматических аминокислот. Взаимодействие сольватированного электрона с цистином приводит к разрыву дисульфидного мостика в белке и появлению свободного радикала цистеина.

Все эти свободные радикалы играют важную роль в возникновении радиационных повреждений тканей и при УФ-ожогах. Сольватированный электрон может захватываться молекулярным кислородом с появлением супероксидного анионрадикала – одной из активных форм кислорода.

Радикалы цистеина могут рекомбинировать, образуя цистин, а в присутствии кислорода они могут вступать с ним во взаимодействие, что приводит к появлению продуктов типа цистеин-сульфоновой кислоты.

Разрушение дисульфидных групп в белках может происходить не только под действием света, поглощаемого самим цистином (254 нм), но и под действием фотонов, поглощенных триптофаном (280 или 290 нм). Так называемая триптофановая инактивация белков. Она осуществляется по одноквантовому, одноударному механизму

С меньшей эффективностью происходит разрушение алифатических аминокислот, сопровождающееся выделением аммиака, что свидетельствует о дезаминировании. В присутствии алифатических дипептидов, например глицил-глицина, фотоионизация ароматических аминокислот приводит

появлению анион-радикала пептидной группы, и дальнейшие превращения этого радикала могут заканчиваться диссоциацией пептидной связи в соответствии со следующей схемой (рис. 11).

На следующем рисунке представлена общая схема при ультрафиолетовом облучении белка. Конформационный фактор оказывает существенное влияние на фоточувствительность белков. Самые различные физические и физико-химические воздействия, вызывающие структурные перестройки макромолекул, приводят к значительным изменениям квантовых выходов инактивации, что является доказательством фоточувствительности. Зависимость фотоинактивации белков от конформационного фактора позволяет характеризовать структурное состояние белка по уровню его фоточувствительности не только в растворе и но и в клетке.

В основе биологических мембран белки вовлекаются в интенсивные межмолекулярные взаимодействия, которые контролируют их структурное состояние, вследствие этого конформация и, следовательно, фоточувствительность белков в составе биологических мембран и в растворе должны различаться. «Судьба» мембранного фермента зависит не только от эффективности фотохимических процессов в нем, но и от фотохимических реакций в соседних компонентах, приводящих к структурным перестройкам мембран. При инактивации ферментов в растворе УФ-свет выступает в роли необратимого неконкурентного ингибитора, то есть, в растворе представлены только активные, немодифицированные и полностью инактивированные молекулы фермента. Поэтому по мере УФ-облучения уменьшается только максимальная скорость ферментативной реакции, а константа Михаэлиса

i_5b9bb6b3453d6606

остаётся неизменной. В противоположность ферментам в растворе мембранная ацетилхолинэстераза инактивируется по типу смешанного ингибирования с одновременным изменением максимальной скорости и константы Михаэлиса. Наряду с изменениями каталитических параметров после УФ-облучения наблюдаются модификация и физико-химических свойств остаточного мембранного фермента. В случае эритроцитарной ацетилхолинэстеразы зарегистрированы, например, изменения характера рН-зависимости ее активности, константы ингибирования прозеринном, термостабильности, энергии активации ферментативной реакции.

Эффект изменения структурно-функционального поведения мембранного фермента, обусловленный стерическим возмущением его конформации в результате фотомодификации структуры мембраны за его пределами, получил название феномена фотохимической аллотопии. Появление феномена фотохимической аллотопии, обусловлено главным образом фотохимическими повреждениями белков, которые под влиянием УФ-света «сшиваются» с соседними компонентами межмолекулярными ковалентными сшивками.

Феномен фотохимической аллотопии проявляется только на целостных, интактных мембранах, сохранивших присущую им «мозаику» межмолекулярных сил и взаимодействий.

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 фермента.

2. Необратимая активация фермента, связанная с фотохимическим разрывом (или образованием) ковалентных связей.

К первому типу относятся фотореактивирующий фермент – 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 — α -кетобутиратом ($\lambda=320$ нм).

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 (< 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 (рис. 12). Квантовый выход такой реакции значительно превышает единицу — например, 90 для молекулы этиллинолеата. Показано, что механизмы фотоокисления и цепного свободнорадикального автоокисления липидов очень близки. Их единство доказывается также сходством кинетики авто- и фотоокисления ненасыщенных жирных кислот. На основании этого фотоокисление липида

i_5b9bb6b3453d6606

можно представить в виде определенной последовательности реакций (схема 2).

Свободнорадикальное окисление липидов начинается с реакции инициирования 0. Инициаторами могут служить свободные радикалы кислот, АФК, УФ-излучение. Свет через образование первичного свободного радикала R иницирует цепную реакцию перекисного окисления; R, взаимодействуя с кислородом, превращается в перекисный радикал RO_2 , который реагирует с молекулой жирной кислоты RH. При этом регенерирует радикал R и возникает молекула гидроперекиси. Эти реакции 1 и 2 являются продолжением цепи окисления липида. Далее следует реакция разветвления 3, когда гидропероксиды разлагаются, иницируя новые цепи. Разветвление происходит в присутствии ионов двухвалентного железа, под действием УФ-облучения или, значительно реже, спонтанно. Не все радикалы RO_2 и R продолжают цепь, часть их рекомбинирует друг с другом, давая неактивные продукты 4, 5 и 6. Помимо реакций спонтанного обрыва цепей, цепи могут прерываться антиоксидантами. Самым распространенным из них является Витамин E (токоферол), который при этом образует малоактивные радикалы. Наиболее активен витамин E в относительно низких концентрациях (*in vitro* 10^{-6} M), когда невелика роль реакций 10-12. Витамин E имеет максимум поглощения 292 нм и при УФ-облучении легко фотолизируется (13). В отсутствие антиоксиданта реакции 7 и 8 осуществляться не могут и перекисное окисление активизируется. Реакция 6 приводит к образованию продуктов в электронно-возбужденном состоянии и сопровождается испусканием квантов света (хемилюминесценцией). Таким образом, можно

i_5b9bb6b3453d6606

использовать хемилюминесцентный метод для диагностики перекисного окисления липидов и др. целей.

Из схемы 2 следует, что хотя фотолиз липидов в целом нуждается в участии кислорода, но в нем все же есть стадии, в которых непосредственно присоединение кислорода не происходит, например реакция 3.

Теперь рассмотрим более подробно некоторые из реакций. Первичной фотохимической реакцией, приводящей к образованию радикала липида, является отрыв электрона или атома водорода от одного из атомов углерода жирной кислоты. С энергетической точки зрения энергии кванта света с длиной волны 240 нм, равной около 120 ккал/моль, вполне достаточно, чтобы разорвать любые С—Н-связи в жирных кислотах. Энергия С—Н-связей составляет 93 ккал/моль для насыщенных соединений с длинной цепью, 89 ккал/моль для связи у С=C-углеродных атомов ненасыщенных соединений и 77 ккал/моль для связи у углерода, находящегося в α -положении к С=C-связи. Поэтому при прочих равных условиях более вероятен разрыв С—Н-связей у α -углеродного атома.

В случае ненасыщенных жирных кислот при образовании RO_2 и $ROOH$ связь С=C перемещается и возникает сопряженная (конъюгированная) система двойных связей (рис. 13).

Возможно также образование из двух перекисных радикалов димерного бирадикала $R_1-O-O-R_2$. Цепи свободнорадикального окисления имеют различную длину вследствие их обрыва при взаимодействии радикалов, приводящем к образованию молекулярных продуктов нерадикальной природы. Цепи обрываются также под влиянием металлов переменной

валентности (например, железо) и антиоксидантов (например, α -токоферол).

Образовавшиеся гидроперекиси претерпевают дальнейшие химические превращения с образованием ряда стабильных продуктов окисления и прежде всего альдегидов (рис. 14).

Типичный представитель конечных продуктов окисления — малоновый диальдегид, который идентифицируется в липидных препаратах по реакции с тиобарбитуровой кислотой (рис. 15). При этом образуется окрашенное соединение с максимумом поглощения при 532 нм. Образование конечных продуктов окисления — липидов включает две последовательные фотохимические реакции (рис. 16).

Процесс в целом носит двухквантовый характер, причем реакция распада гидроперекисей (вторая стадия) происходит и в отсутствие кислорода. Двухквантовый двухстадийный механизм перекисного фотоокисления липидов делает его зависимым от длины волны действующего света: длинноволновый УФ-свет приводит к накоплению преимущественно гидроперекисей, в то время как коротковолновое излучение, интенсивно поглощаемое гидроперекисями, способствует образованию конечных продуктов (альдегидов).

Как известно, в клетках преобладающая часть липидов сосредоточена в биологических мембранах. В липидной фазе мембран наиболее существенной и эффективно протекающей реакцией является перекисное, свободнорадикальное фотоокисление полиненасыщенных жирных кислот — фосфолипидов. При этом фотолиз может 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 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.

Последствия окисления фосфолипидов – это в первую очередь нарушение барьерных функций биомембран для ионов и других молекул. 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. Свободнорадикальное окисление липидов играет

ведущую роль в развитии УФ-эритемы кожи, световых ожогов глаз, радиационных повреждений, отравлений четыреххлористым углеродом и других патологических состояний организмов. Однако в нормальной мембране цепное перекисное фотоокисление липидов, по-видимому, заторможено вследствие структурных ограничений и наличия разнообразных антиоксидантов.

Механизмы фотосенсибилизированных реакций в биологических системах.

Биологические объекты обладают чувствительностью к свету за счет наличия эндогенных хромофоров. Фотобиологические процессы – зрение, фотомутагенез, эритема и др. – индуцируются, если под действием света соответствующих длин волн возбуждаются молекулы зрительных пигментов, белков, нуклеиновых кислот или других нормально содержащихся в объекте хромофоров. В некоторых случаях наблюдается резкое повышение светочувствительности биологических систем. Чаще всего это происходит при попадании в объект экзогенных хромофоров, например каких-либо красителей, поглощающих видимый свет или УФ-свет. Иногда фоточувствительность возрастает при заболевании. Например, в тканях человека при нарушениях эритропоэза или отравлениях свинцом резко повышается содержание протопорфиринов, и фотохимические реакции с их участием начинают играть более заметную роль по сравнению с нормой.

В фотобиологии соединения, повышающие чувствительность биообъектов к свету называют фотосенсибилизаторами. Механизмы фотохимических реакций фотосенсибилизаторов крайне многообразны, так

же как механизмы действия экзогенных хромофоров.

Фотосенсибилизированные процессы можно разделить на 2 типа:

1. Нуждающиеся в кислороде
2. Независимые от кислорода.

Фотобиологические эффекты, для осуществления которых требуется участие трех составляющих – света, кислорода и красителя – принято называть фотодинамическими эффектами, а соответствующие красители – фотодинамическими красителями.

Рассмотрим сначала 2 тип реакций – реакций не нуждающиеся в кислороде. Один из примеров мы подробно рассмотрели на прошлой лекции: фотолиз цистина в макромолекулах белков при действии УФ-излучения с длинами волн более 280 нм. Собственное поглощение цистина здесь очень мало и не может объяснить высокую эффективность фотолиза. Фотосенсибилизаторами этого процесса служат ароматические аминокислоты триптофан и тирозин. Возбужденные молекулы ароматических аминокислот ионизируются, генерируя e^- . Цистин захватывает e^- , образуя анион-радикал цистина, последние распадаются преимущественно по связи между атомами серы. Разрыв дисульфидных мостиков – одна из наиболее существенных реакций, ответственных за утрату ферментативной активности.

Другим примером кислород-независимых фотосенсибилизированных реакций является фотоприсоединение псораленов (фурокумаринов) к пиримидиновым основаниям ДНК. Наибольшей фотобиологической активностью обладают псорален, 8-метилпсорален, 8 – метоксипсорален.

Например, в их присутствии облучение ближним УФ-светом (>310 нм) вызывает эритему кожи, инактивацию вирусов, бактериальных и животных клеток. Установлено, что эти эффекты не фотореактивируются. Такие реакции ответственны за летальные и мутагенные эффекты у микроорганизмов, а также лежат в основе терапевтических эффектов при фотохимиотерапии псориаза и других заболеваниях кожи. Совместное воздействие псораленов и УФ-А-излучения называют ПУФА-терапией.

При действии ближнего ультрафиолета (УФ-А, 320-400 нм), не поглощаемого тимином, псорален возбуждается и вступает в реакцию присоединения, образуя с тимином несколько циклобутановых аддуктов. Спектральные свойства соединений III и IV отличаются от свойств V и VI. Поэтому их дальнейшая фотохимическая судьба различна. Соединения III и IV способны поглотив фотон УФ-А, вступить в реакцию фотоприсоединения еще с одним тиминном из другой нити ДНК, если такой тимин рядом имеется. Таким образом, после последовательного поглощения двух квантов молекула псоралена может ковалентно связать между собой две нити ДНК.

Фотопродукты взаимодействия псоралена и тимина, содержащие 1 молекулу тимина, называют моноаддуктами; а содержащие 2 молекулы тимина – диаддуктами (сшивками в ДНК). Возникновение диаддуктов – главная причина летального действия УФ-облучения на микроорганизмы в присутствии псоралена, тогда как моноаддукты в большей степени ответственны за мутагенные сшивки.

Некоторые реакции хлорпромазина также могут служить примером фотосенсибилизированной реакции. Хлорпромазин используется для лечения

психических заболеваний. Побочным эффектом терапии оказалось повышение чувствительности кожи пациентов к свету. Первичные фотопродукты в реакциях хлорпромазина – нейтральные свободные радикалы (а) или катион-радикал и сольватированный электрон (б). Эти нестабильные реакционные фотопродукты могут реагировать с биомолекулами. Хлорпромазин с высокой эффективностью присоединяется к белкам через стадию образования нейтральных продуктов. Эта реакция лежит в основе фотоинактивации бактериофагов.

Фотодинамическое действие. Общая характеристика.

Фотодинамическое действие — это необратимое повреждение светом биологических структур (или функций) в присутствии кислорода, сенсibilизированное введенными в клетки или организмы хромофорами (например, красителями). Комбинация краситель + свет + кислород является, как правило, необходимым признаком этой реакции.

Фотодинамически активные красители можно подразделить на три класса:

1) обладающие большим сродством к кислороду и малым сродством к восстановителям (ксантины, акридины, тиазины, некоторые порфирины, рибофлавин);

2) являющиеся хорошими акцепторами водорода в возбужденном состоянии (антрахиноны, производные индантрена — флавантрен, пирантрен);

3) сходные по структуре с веществами предыдущей группы, но обладающие умеренным сродством к кислороду.

Общей особенностью всех фотодинамических красителей является их способность к флуоресценции, т. е. к удержанию поглощенной энергии в течение достаточно длительного времени (не менее 10^{-9} с).

Фотосенсибилизирующей активностью обладает также ряд фармакологических (анестетики, антибиотики, барбитураты и др.) и канцерогенных веществ.

К фотодинамическому действию чувствительны практически все биологические объекты: биологические молекулы различных размеров, биополимеры, внутриклеточные органеллы, клетки, ткани, вирусы растений, фаги, микроорганизмы, высшие и низшие растения, беспозвоночные и позвоночные животные.

Следует подчеркнуть, что при фотодинамическом действии на организмы и клетки могут повреждаться любые функции и структуры, свойственные живой материи. Так, наблюдаются летальные (бактерицидное действие, инактивация фагов и т. д.), лизогенные, мутагенные, канцерогенные эффекты, нарушение и стимуляция деления клеток, хромосомные aberrации, подавление фотосинтеза, реакции Хилла, синтеза ДНК, РНК и белка, угнетение гликолиза, дыхания, окислительного фосфорилирования, деструкция ферментов и нуклеиновых кислот, нарушение проницаемости мембран, подавление двигательной активности, эритема, некрозы и эдема кожи, сенсорная стимуляция, изменение температуры и артериального давления крови, аллергия, циркулярный коллапс и т. п.

Понятно, что для каждого отдельного сенсибилизатора и биологического объекта первично повреждаются не все, а одна или несколько

определенных, наиболее чувствительных жизненно важных структур (функций). Следствием первичного повреждения «слабого места» являются нарушение других структур (функций) и только затем – гибель клетки или организма. Какие молекулярные структуры клетки повреждаются в первую очередь, определяется, с одной стороны, природой красителя, с другой — особенностями биологического объекта:

- 1) т.е. проницаемостью клеток для хромофора
- 2) и его микрораспределением внутри клетки (комплексирование с макромолекулами).

Иными словами, в каждом конкретном случае (определенный краситель и определенный биологический объект) могут первично повреждаться самые различные молекулярные структуры: структурные белки мембран, различные ферменты, фосфолипиды, РНК, ДНК.

Природа акцептора фотодинамически активного света очевидна. Это проникший в клетку хромофор (краситель). Поэтому спектры действия фотодинамического повреждения должны совпадать со спектрами поглощения красителя, что и наблюдается в эксперименте.

Во многих случаях фотодинамическое повреждение биологических объектов протекает по одноквантовому одноударному механизму. Однако у некоторых микроорганизмов сенсibilизация летального и мутагенного действия света имеет различные механизмы. Например, у нейроспоры фотодинамический бактерицидный эффект — одноударный, а мутагенный — двухударный процесс. Наконец, если кванты света через фотодинамический эффект адресуются ферментам, содержание которых в клетке велико

i_5b9bb6b3453d6606

(например, данный фермент представлен 1000 молекулами), то фотодинамическое действие будет протекать по МНОГОударному механизму, поскольку инактивация одной или нескольких молекул не приведет к гибели клетки. Наоборот, гибель клеток или фагов в результате фотодинамического повреждения ДНК является, как правило, одноударным процессом.

Основная часть изученных фотосенсибилизированных процессов нуждается в присутствии кислорода. Как правило, в фотоокислительных реакциях участвуют триплетные состояния сенсibilизаторов. Молекулы в триплетном состоянии или другие короткоживущие интермедиаты могут химически взаимодействовать с молекулами субстрата в реакциях переноса водорода или электрона. Окислительные повреждения субстрата в реакциях фотодинамического действия осуществляются высокорекреационным синглетным кислородом, или супероксидным радикалом. При переносе электрона на кислород образуется супероксидный анионрадикал. При переносе электрона или атома водорода на другие субстраты кислород взаимодействует с короткоживущими промежуточными соединениями, образуя продукты фотоокисления. Другой путь фотоокислительных реакций косвенный молекула сенсibilизатора в триплетном состоянии химически не участвует в реакции, а передает энергию возбуждения на молекулярный кислород, образуя электронно-возбужденный (синглетный) кислород $^1\text{O}_2$. Активность $^1\text{O}_2$ в окислительных реакциях в ~ 100 раз выше, чем невозбужденного кислорода. Схема фотореакций с участием $^1\text{O}_2$ следующая.

Сенсibilизатор поглощает квант света и переходит в синглетное возбужденное состояние. В результате интеркомбинационной конверсии

образуется триплетное состояние сенсibilизатора, способного взаимодействовать с невозбужденным кислородом и передавать ему энергию с образованием электронно-возбужденного синглетного кислорода. Синглетный кислород переходит в основное состояние либо с высвечиванием кванта люминесценции, либо безызлучательным путем; последнее связано с тушением люминесценции посторонними молекулами

Основное состояние кислорода — триплетное, он имеет два неспаренных электрона, находящихся на разных орбиталях. Электроны локализованы преимущественно так, что каждый из них находится на одном из двух ядер. В спектроскопии это состояние обозначается 3_g . В химических уравнениях пишут 3O_2 или просто O_2 . Синглетный кислород способен существовать в двух возбужденных состояниях, одно из которых обладает продолжительным временем жизни. Электронно-возбужденные состояния кислорода — синглетные обозначаются $^1\Delta_g$ и $^1_{g+}$ (или просто 1O_2).

Свойства синглетного кислорода в обоих состояниях различны. Важно, что $^1_{g+}$ состояние эффективно тушится водой, в связи с этим его время жизни меньше 10^{-10} с. Поэтому в реакциях, происходящих в водных растворах (как это имеет место в биологических системах), важен только $^1\Delta_g$, а $^1_{g+}$ инактивируется, не успевая диффундировать к субстрату окисления.

Следует отметить, что β -каротин, являющийся дезактиватором триплетных состояний и синглетного кислорода, резко тормозит фотодинамическое действие света.

Первичная фотохимическая реакция при фотодинамическом действии сводится к окислительно-восстановительным превращениям. Можно думать,

что в большинстве случаев реакции идут через свободнорадикальные промежуточные состояния субстратов, как это установлено, например, для фенола, тирозина и триптофана.

В качестве партнеров по окислительно-восстановительным превращениям могут выступать самые разнообразные биологически важные вещества. При этом наиболее эффективно будут разрушаться те вещества, с которыми краситель из-за повышенного сродства либо образует комплекс, либо находится в непосредственной близости. В многочисленных опытах *in vitro* удалось показать, что фотодинамическим путем окисляются практически все биологически важные вещества: органические кислоты, спирты, альдегиды, кетоны, амины, эфиры, фенолы, пироллы, индолы, азотистые гетероциклические соединения, стероиды, аминокислоты (цистеин, триптофан, тирозин и др.), пурины, нуклеиновые кислоты и белки.

Липиды

Свет, поглощаемый красителями, вызывает сенсibilизированное окисление жирных кислот, причем эффективность их фотоокисления возрастает по мере увеличения ненасыщенности жирных кислот. Ведущую роль в этом процессе играет синглетный кислород. Как в модельных липидных системах, так и в биологических мембранах возможно фотодинамическое перекисное окисление липидов, протекающее по типу цепной реакции с образованием свободных радикалов. Сенсibilизированное перекисное окисление липидов зарегистрировано в наружных сегментах палочек сетчатки (сенсibilизатор — родопсин) и в мембранах эритроцитов (сенсibilизатор — протопорфирин).

Белки

Действие на белки. Фотодинамически активные красители повреждают белок либо в адсорбированном на макромолекуле состоянии, либо в момент столкновения возбужденной молекулы красителя с белком. Белки повреждаются различными красителями по одноквантовому, одноударному механизму.

Квантовый выход фотосенсибилизированной инактивации понижается в присутствии многих веществ: аминокислот, восстановителей, других белков, ионов некоторых металлов, йодидов. В некоторых случаях описана защита белка одним фотодинамически активным красителем от действия другого (явление антагонизма).

Квантовый выход фотодинамического действия слабо зависит от температуры, что свидетельствует об определяющей роли фотохимической реакции в суммарном процессе, неотягощенном температурно-активируемыми темновыми химическими стадиями.

Фотодинамическое действие реализуется не через разрывы пептидных связей, а прежде всего через окисление остатков таких аминокислот, как гистидин, триптофан, тирозин, метионин, цистеин, причем наиболее легко окисляется гистидин и триптофан. Варьируя красители и характеристики среды, можно достичь более или менее избирательной деструкции определенных аминокислот. Например, гистидин разрушается при $\text{pH} \sim 6$ (азот имидазола ионизирован), тирозин — при $\text{pH} > 10$ (ионизирована гидроксильная группа фенольного кольца). Как правило, расположенные на поверхности белковой глобулы аминокислоты, разрушаются более

эффективно, чем расположенные в ее сердцевине.

УФ-облучение приводит к образованию лабильных промежуточных продуктов — аланин-феноксильных и 3-индольных свободных радикалов. Конечными стабильными продуктами фотоокисления триптофана являются кинуренины и меланины, цистина — цистеиновая кислота; гистидин и тирозин дают большой набор продуктов.

Обычно вслед за образованием стабильных фотохимических продуктов происходят конформационные перестройки белковой макромолекулы, на что указывают изменения ряда конформационно-чувствительных параметров: дисперсии оптического вращения, электрофоретической подвижности, вязкости, седиментационных характеристик, растворимости, ион- и коэнзимсвязывающих свойств, количества титруемых SH-групп, чувствительности к температуре и протеолитическим ферментам.

Результатом структурных перестроек являются изменения функциональной активности белков (каталитическая, иммунологическая, гормональная активность). Потеря функциональных свойств белков может быть вызвана и прямым разрушением аминокислотных остатков, входящих в активный центр фермента.

Нуклеиновые кислоты

Фотосенсибилизированной инактивации нуклеиновых кислот свойственны такие же физические закономерности, как и инактивации белков. Из пуриновых и пиримидиновых оснований наиболее чувствителен к сенсibiliзирующему действию красителей гуанин. При фотосенсибилизированном разрушении гуанина происходит разрыв обоих

i_5b9bb6b3453d6606

колец основания с образованием рибозы, мочевины, рибозил-мочевины и гуанидина. В фотоокислении гуанозина принимают участие как синглетный кислород, так и свободнорадикальные продукты. Флавины вызывают быстрое фотоокисление аденина и его нуклеотидов.

При фотосенсибилизированной инактивации нуклеиновых кислот не происходит разрывов рибозо-фосфатного остова. Как и в случае белков, реакция фотоокисления нуклеиновых кислот приводит к глубоким структурным перестройкам, о чем свидетельствуют изменения вязкости, температуры плавления ДНК, полярографического поведения, иммунологических свойств, чувствительности к гидролитическим ферментам. При фотодинамическом действии образуются также поперечные сшивки между ДНК и белком, что уменьшает экстрагируемость нуклеиновой кислоты из клетки.

Структурно-химические повреждения нуклеиновых кислот ведут к значительным нарушениям их биологической активности. Так, ДНК вируса табачной мозаики теряет инфекционную, а ДНК пневмококка — трансформирующую активность. Синтетическая полиуридил-гуаниловая кислота утрачивает матричную активность при синтезе полипептидов в опытах *in vitro*, а транспортная РНК кишечной палочки — способность связывать аминокислоты. При облучении ДНК, полиаденилгуаниловой и полицитидиловой кислот в присутствии фотодинамических красителей снижается их матричная активность.

Вирусы и клетки

Фотосенсибилизированная инактивация вирусов протекает по

одноударному механизму, что говорит о преимущественной роли в таких повреждениях нуклеиновых кислот. Наиболее эффективными оказались красители, которые обладают высоким сродством к нуклеиновым кислотам и активно комплексируют с ними в растворе.

С другой стороны, фотодинамическая активность красителей зависит от степени их проникновения через белковый чехол к нуклеиновой кислоте фага. Так при обработке фагов мочевиной, разрыхляющей белковую оболочку и облегчающей проникновение красителя к ДНК, увеличивалась чувствительность фагов к свету. Таким образом, первичное повреждение вирусов преимущественно локализовано в нуклеиновой кислоте. Это тем более справедливо для мутаций вирусов, обусловленных фотодинамическим действием. При фотодинамическом повреждении бактериофагов наблюдаются разрывы полинуклеотидной цепи.

Менее ясен вопрос о путях реализации фотодинамического действия на уровне более сложноорганизованной системы — клетки, где, по-видимому, могут повреждаться как белки, так и нуклеиновые кислоты.

Для бактерий описаны как одно-, так и многоударные кривые летального действия. Мишени для фотодинамического удара в значительной мере определяются избирательностью накопления и сорбции красителей в различных структурах клетки. Например, акридиновые красители преимущественно концентрируются на хромосомах и вызывают их разрывы. Порфирины эффективно накапливаются в лизосомах и также повреждают их. Существенный вклад в фотосенсибилизированное повреждение клеток вносят и биологические мембраны. К настоящему времени

i_5b9bb6b3453d6606

фотодинамическое повреждение мембран, проявляющееся в нарушении их структуры и функции (проницаемость, активность ферментов), продемонстрировано в большом числе опытов. В частности, показана фотодинамическая деполяризация нервных и мышечных волокон, нарушение барьеров проницаемости мембран лизосом с их разрывом и выходом гидролитических ферментов, выход ионов K^+ через плазматические мембраны клеток, разобщение дыхания и фосфорилирования в изолированных митохондриях.

По-видимому, по крайней мере, некоторая часть мембранных эффектов связана с сенсibilизированным окислением липидов.

Многоклеточные организмы

Остановимся лишь на отдельных фотосенсibilизированных реакциях, возникающих естественным путем, без специального «прокрашивания» тканей за счет эндогенных пигментов. Таким образом летально повреждается светом морская анелида *Tubifex*, простейшие *Blepharisma* (пигмент — зоопурпурин), некоторые растения и водоросли (пигмент — хлорофилл).

Гиперчувствительность к видимому свету, обусловленная повышенным содержанием порфиринов вследствие нарушения их метаболизма, характерна для млекопитающих животных и человека. Она может быть вызвана накоплением в коже и открытых для солнца местах тела животных фотодинамических веществ растительного происхождения, например гиперидина, который содержится в некоторых растениях (зверобой).

Питающиеся такой травой овцы на ярком солнечном свете заболевают и даже гибнут. Нарушение функции печени приводит к накоплению в коже

фотодинамически активного производного хлорофилла — филлоэритрина. Наконец, гиперчувствительность человека к свету может быть вызвана некоторыми лекарственными препаратами. Заболевания, вызванные фотодинамическим эффектом, обусловлены в основном вторичными явлениями, связанными с токсическим действием диффундирующих в кровь фотохимических продуктов.

Резюмируя сказанное, можно представить себе следующую наиболее вероятную схему фотодинамического действия: свет сенсibilизатор триплетное состояние сенсibilизатора окислительные превращения с участием биологического субстрата (чаще всего с участием O_2) фотопродукт структурные перестройки макромолекул биологический эффект.

ЛЕТАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ СВЕТА

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.

Еще в 1929 г. Гейтс показал, что спектр действия летальности микроорганизмов совпадает не со спектром поглощения клетки в целом, а со спектром поглощения нуклеиновых кислот. В дальнейшем этот факт был подтвержден многочисленными экспериментами. И как мы уже знаем - это связано с фотодинамическим или окислительным повреждением макромолекул – нуклеиновых кислот.

Как правило, спектры действия летального эффекта имеют выраженный нуклеиновый максимум при 260— 265 нм (рис. 1). 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 тысяч 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. Возможно, из-за возникновения свободнорадикальных молекул. Дальний ультрафиолетовый свет ($\lambda < 200$ нм), наоборот, весьма эффективен, что может быть обусловлено его ионизирующим действием, о чем мы уже говорили.

ИНАКТИВАЦИЯ ФАГОВ И ПЛАЗМИД

Квантовый выход инактивации различных фагов колеблется от 10^{-2} до 10^{-5} . Строение фагов достаточно просто — одна молекула ДНК или РНК и белковый чехол. Как и все вирусы, фаги не обладают собственным метаболизмом. Потеря фагом биологической активности может быть результатом повреждения нуклеиновой кислоты (тогда он теряет способность к размножению) или белкового чехла (тогда фаг неспособен проникнуть в клетку).

Как правило, потеря вирулентности осуществляется по одноударному механизму и имеет «нуклеиновый» спектр действия (рис. 1, 2). Дополнительное облучение уже инактивированного фага повреждает по многоударному механизму его чехол (белковый спектр действия), что связано с фотоденатурацией многих молекул белка (см. рис. 1). Однако у некоторых фагов фоточувствительность нуклеинового и белкового компонентов соизмерима. Так, белковый спектр действия с максимумом при 280 нм (см. рис. 1) был получен для подавления способности к агглютинации вируса гриппа. У некоторых фагов (бактериофаг *Bact. megatherium*, фаг T1 и др.) в спектрах действия потери инфекционной активности наряду с более значительным нуклеиновым максимумом при 260 нм представлен и белковый максимум при 280 нм.

Появление белкового максимума может быть обусловлено повреждением чехла с потерей фагом сорбционно-проникающих свойств, повреждением ДНК свободнорадикальными продуктами фотолиза белка и

сшивками ДНК — белок.

Характер элементарных фотохимических реакций в нуклеиновых кислотах, приводящих к гибели фагов, в настоящее время более или менее ясен. Инактивация ДНК-содержащих фагов, по-видимому, связана с фотодимеризацией, а не фотогидратацией оснований, поскольку после пострадиационной тепловой обработки, достаточной для разрушения гидратов, их активность не восстанавливается.

Наконец, летальные УФ-повреждения ДНК фагов фотореактивируются. Так, после проникновения в клетку-хозяина активность Т-фагов возрастает примерно в 1000 раз при облучении видимым светом. Это обусловлено тем, что тиминовые димеры, как мы знаем, могут разрушаться в ходе фотореактивации.

Кроме того, в цепи ДНК существуют критические и некритические участки. Роль различных участков ДНК неравноценна и димеризация оснований в значительной части ДНК может не приводить к инактивации.

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 (Т—Т) 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.

УФ-свет эффективно инактивирует и плазмиды — вне-хромосомные ДНК бактериальных клеток. Плазмиды представляют собой двухцепочечные кольца, закрученные в суперспираль. Основной вклад в инактивацию плазмид вносят пиримидиновые димеры.

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.

Чувствительность микроорганизмов к УФ-свету широко варьирует в

зависимости от вида. 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.

Низкую резистентность имеют клетки животных и человека в культуре. 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 сенсбилизаторами.

Решающая роль ДНК в летальном эффекте УФ-лучей находит отражение в спектрах летального действия самых разнообразных одноклеточных биологических объектов (рис. 3). 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.

Вклад других фотохимических повреждений ДНК невелик. Однако в отдельных случаях роль такого повреждения, как сшивки белок — ДНК, становится весьма весомой. Вероятно, что именно из-за таких повреждений гибнут животные клетки в культуре.

В противоположность вегетативным формам споры микроорганизмов отличаются высокой резистентностью к ультрафиолету. Даже при фотопревращении 40% всех тиминовых остатков они сохраняют жизнеспособность. Из-за образования в спорах аномального нециклобутанового фотохимического продукта, что обусловлено особой конформацией ДНК.

В заключение необходимо сделать некоторые замечания общего характера. Гибель клетки от фотохимического повреждения наступает вследствие: 1) летальных мутаций; 2) утраты хотя бы одной из молекул ДНК способности к репликации; 3) нарушения процесса транскрипции. Механизмы гибели клетки через белковые хромофоры изучены слабо. Можно предположить самые различные варианты: инактивацию ключевых ферментов, нарушение проницаемости мембран, сшивки белок— ДНК, летальный мутагенез продуктами белковой фотохимии и др.

ИНГИБИРОВАНИЕ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СИНТЕЗОВ

Одной из непосредственных причин гибели клеток при их облучении ультрафиолетовым светом является инактивация биосинтетического аппарата, ответственного за синтез жизненно важных макромолекул: ДНК, РНК и белков.

В зависимости от видовой принадлежности и физиологического состояния биологических объектов взаимоотношения между скоростью подавления синтезов РНК и белка могут быть различными, причем чаще всего более чувствителен синтез РНК. Фоточувствительность биосинтезов различных видов РНК возрастает в ряду т-РНК—и-РНК—р-РНК. Известно также, что рибосо-мальная РНК 23S более чувствительна, чем 16S или 4S.

В свою очередь синтез различных ферментов в клетке одного и того же микроорганизма и идентичных ферментов в разных микроорганизмах подавляется с неодинаковой эффективностью. Например, индукционный синтез ферментов подавляется раньше, чем суммарный синтез белков.

Синтез ДНК и белка ингибируется по одноударному, РНК — по двухударному механизму, что может быть объяснено необходимостью повреждения двух участков ДНК для прекращения транскрипции.

Общее торможение синтеза белка приписывается замедлению синтеза и-РНК и белка рибосомами вследствие потери терминальных кодонов и-РНК при фрагментации. Это затрудняет своевременный отрыв рибосомы с полипептидной цепью от матрицы. Торможение синтеза белка может быть обусловлено также задержкой синтеза рибосом.

ЗРЕНИЕ

Фотобиологические процессы, лежащие в основе зрения, относятся к информационным физиологическим реакциям. Действительно, зрение позволяет животным дистанционным путем получать информацию об окружающем мире и правильно ориентироваться во внешней среде, в частности корректировать свое поведение и передвижение в зависимости от условий окружения. Еще большее значение зрение имеет для человека, обладающего второй сигнальной системой. Принято считать, что около 90% всех знаний человек получает через зрительный анализатор.

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

Размеры зрительных клеток у различных представителей животного мира сильно варьируют.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФОТОРЕЦЕПЦИИ

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

Энергетические уровни зрительных пигментов располагаются так, что создаются оптимальные условия для поглощения квантов естественного света. В то же время эти пигменты включены в состав липопротеидных мембран фоточувствительных клеток, например, палочек и колбочек позвоночных, что, в свою очередь, создает условия для высокоэффективной трансформации энергии света в энергию нервного импульса. По вполне понятным причинам спектры действия зрительной рецепции совпадают со спектрами поглощения пигментов (рис. 3).

Фоточувствительные клетки снабжены эффективным аппаратом темнового усиления сигнала. При этом коэффициент усиления по мощности достигает величин порядка 10^5 - 10^6 . В результате даже одного-единственного кванта света оказывается достаточно для генерации нервного импульса, например, у членистоногих обитателей Атлантики - мечехвостов. Адаптированный к темноте глаз человека в состоянии регистрировать попадание трех квантов света.

Таким образом, зрительный рецептор несет в себе черты выраженного триггерного устройства. Квант света через родопсин инициирует мощные

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

Палочки – это высокоспециализированные нервные клетки, имеющие специализированные отростки (наружные сегменты), окончания которых обращены в сторону наружной поверхности сетчатки. Внутренний и наружные сегменты, связаны между собой тонкой соединительной ножкой, или ресничкой (рис. 4). Внутренний сегмент, включающий внутриклеточные органеллы (митохондрии, рибосомы и др.) переходит в ядерно-плазматическое тело, базальная часть которого снабжена пресинаптическим окончанием, вступающим в контакт с биполярными клетками. Ножка играет важную роль в транспорте метаболитов (белки, АТФ и т. д.), которые нужны

i_5b9bb6b3453d6606

для обновления и функционирования наружного сегмента. В частности, через ножку в наружный сегмент переносится родопсин, синтезируемый рибосомами внутреннего сегмента. Наружный сегмент выполняет фоторецепторную функцию клетки. Он заполнен стопкой дисков, ориентированных перпендикулярно к длинной оси клетки. Диск представляет собой двойную мембрану с замкнутым внутренним пространством (рис. 5). Диски как бы плавают в цитоплазме наружного сегмента и, по-видимому, не связаны с наружной мембраной палочки.

Наружные сегменты палочки позвоночных содержат стопку из сотен или даже тысяч так называемых фоторецепторных дисков. Диски образуются у основания наружного сегмента как впячивание 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 ведет свое происхождение от внеклеточного пространства.

Наружные сегменты колбочек имеют принципиальное отличие от наружных сегментов палочек, заключающееся в том, что колбочковые диски представляют собой складки плазматической мембраны и их внутриклеточное пространство сообщается с внеклеточной средой.

В мембранном материале наружных сегментов весовое отношение между мембранами дисков и наружной мембраной составляет 100:1.

Фосфолипиды мембран наружных сегментов содержат большое количество полиненасыщенных жирных кислот. Он может различаться у различных видов животных (таблица).

ФОТОФИЗИКА И ФОТОХИМИЯ ЗРИТЕЛЬНОЙ РЕЦЕПЦИИ

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

Спектр поглощения родопсина характеризуется четырьмя максимумами: в -полосе (500 нм), -полосе (350 нм), -полосе (278 нм) и -полосе (231 нм). Считается, что - и -полосы в спектре обусловлены поглощением ретиналя, а - и -полосы — поглощением опсина.

Основной хромофор зрительного пигмента — 11-*цис*-ретиналь. На каждую молекулу белка в родопсине приходится лишь одна молекула пигмента. 11-*цис*-ретиналь содержит в боковой цепи четыре сопряженные двойные связи, которые обуславливают *цис-транс*-изомерию молекулы пигмента. От всех известных стереоизомеров 11-*цис*-ретиналь отличается выраженной нестабильностью. Концевая альдегидная группа в боковой цепи обладает повышенной реакционной способностью и реагирует с аминокислотами, их аминами и фосфолипидами, содержащими аминогруппы, например, фосфатидилэтанол-амином. При этом образуется альдиминная ковалентная связь — соединение типа Шиффова основания (НС

i_5b9bb6b3453d6606

= N—). Внутримолекулярная часть родопсина состоит из ретиналя и семи трансмембранных α -спиралей, представляющих собой остов опсина. 11-*цис*-ретиналь ковалентно связан с ϵ -аминогруппой лизина через Шиффово основание.

Остатки внутри трансмембранных спиралей выполняют две важные функции:

1. Создают связывающий карман для 11-*цис*-ретиналя и регулируют его спектральные свойства.

2. Участвуют во внутримолекулярных взаимодействиях, которые контролируют третичную структуру белка и динамику его фотоиндуцированных изменений.

В основе механизмов зрения лежит первичная фотохимическая реакция *цис-транс*-изомеризации ретиналя — «распрявление» сопряженной углеводородной цепи хромофора. *Цис-транс*-изомеризация ретиналя протекает по одноквантовому (одноударному) механизму. Поглощение родопсином кванта света приводит к ряду его фотохимических превращений — фотолизу. Первичным актом в этом процессе является изомеризация 11-*цис*-ретиналя в полностью *транс*-форму (рис. 7 А). Изомеризация ретиналя является единственным светозависимым процессом в ходе светоактивации родопсина, все остальные стадии фотолиза светонезависимые, они сопряжены с конформационными перестройками в молекуле опсина и реакциями протонирования–депротонирования основания Шиффа. Между поглощением фотона и изомеризацией ретиналя проходит около 200 фемтосекунд. За этим событием следует образование в течение миллисекунд

i_5b9bb6b3453d6606

нескольких промежуточных форм родопсина, каждая из которых характеризуется своим спектром поглощения. Наибольшую важность для биохимических реакций, приводящих к возникновению фоторецепторного ответа, представляет один из интермедиатов фотолиза родопсина – метародопсин II ($\lambda_{\text{max}} = 380$), который содержит непротонированное основание Шиффа с полностью *транс*-ретином и характеризуется значительными конформационными перестройками в сравнении с темновым родопсином.

В плазматической мембране наружного сегмента палочек позвоночных, отделенной от мембраны дисков, расположены специальные зависимые от циклического гуанозинмонофосфата (сGMP) катионные каналы, специфичные для Na^+ и Ca^{2+} . В темноте часть этих каналов находится в открытом состоянии и катионы Na^+ и Ca^{2+} могут свободно диффундировать из внеклеточного пространства в цитозоль. Поток ионов в темноте или темновой ток, вызывает деполяризацию (уменьшение наружного положительного заряда) плазматической мембраны. Деполяризация вызывает непрерывное высвобождение медиатора из окончаний их аксонов – в точности так, как это происходит в обычных рецепторах при стимуляции. У большинства сенсорных рецепторов – химических, температурных или механических – в ответ на соответствующий стимул происходит деполяризация клеточной мембраны, то есть они ведут себя так же, как и обычные нейроны.

В результате поглощения кванта света молекулой родопсина и последующих за этим биохимических реакций происходит закрытие катионных ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) каналов, что приводит к уменьшению темнового тока и

гиперполяризации (увеличению наружного положительного заряда) плазматической мембраны клетки. Свет, повышая потенциал на мембране рецепторной клетки (гиперполяризуя ее), уменьшает выделение медиатора. Таким образом, стимуляция, как ни странно на первый взгляд, выключает рецепторы. Процессы восприятия, передачи и усиления зрительного сигнала, называются фототрансдукцией.

ЗРИТЕЛЬНЫЙ КАСКАД

Первый шаг процесса фототрансдукции – поглощение кванта света фоторецепторным пигментом, родопсином и переход родопсина в фотоактивированное состояние ($R \rightarrow R^*$). Родопсин относится к семейству рецепторов, сопряженных с G-белками (G-белки – белки, способные связывать гуаниловые нуклеотиды GDP и GTP и принимать участие в трансмембранной передаче разнообразных сигналов). Метародопсин II (R^*) выступает в роли катализатора в процессе активации следующего белка зрительного каскада, трансдуцина (T). Трансдуцин относится к семейству гетеротримерных G-белков и состоит из альфа-, бета- и гамма-субъединиц. T β - и T γ -субъединицы прочно связаны друг с другом и функционируют как единая T $\beta\gamma$ -субъединица. Важнейшей характеристикой трансдуцина, как и всех G-белков, является присутствие на их α -субъединице центра связывания гуаниловых нуклеотидов: GDP и GTP. В темноте (рис. 8, I) T находится в комплексе с молекулой GDP (T-GDP) и связана с димером T $\beta\gamma$. Весь комплекс локализуется на внешней поверхности мембраны дисков и обладает повышенным сродством к метародопсину II. В результате связывания R^* с комплексом индуцируется обмен связанного с T GDP на GTP (рис. 8, II).

Комплекс $R^*-(T-GDP)-T\beta\gamma$ быстро диссоциирует на R^* , активный комплекс T^*-GTP и $T\beta\gamma$. Освобождающийся R^* способен активировать другую молекулу трансдуцина (рис. 8, III). Активация сотен или даже тысяч молекул трансдуцина единственной молекулой фотовозбужденного родопсина является первым этапом усиления в процессе передачи зрительного сигнала.

T^*-GTP , в свою очередь, активирует следующий белок зрительного каскада – фосфодиэстеразу (PDE) циклического GMP (cGMP). По аналогии с другими рецепторными системами, сопряженными с G-белками, в системе родопсин– трансдуцин-фосфодиэстераза cGMP, PDE является эффекторным белком, а cGMP – вторичным мессенджером. Однако в отличие от большинства рецепторных систем, которые служат для передачи сигнала с внешней стороны клеточной мембраны внутрь клетки, белки зрительного каскада передают сигнал с мембраны дисков, расположенной внутри наружного сегмента палочек, на наружную плазматическую мембрану. Рассмотрим этот процесс более подробно. В темноте PDE неактивна, и в цитоплазме палочки поддерживается высокий уровень cGMP за счет активности фермента гуанилатциклазы. В результате этого большая часть cGMP-зависимых катионных (Na^+/Ca^{2+}) каналов в плазматической мембране наружного сегмента палочек находится в открытом состоянии и катионы Na^+ и Ca^{2+} свободно диффундируют из внеклеточного пространства в цитозоль (см. рис. 8, I), что приводит к деполяризации плазматической мембраны. Проникающие в цитоплазму катионы Na^+ удаляются из клетки Na^+/K^+ - АТФ-азой, расположенной в теле палочки (внутреннем сегменте). Внутриклеточная концентрация Ca^{2+} поддерживается на постоянном уровне

i_5b9bb6b3453d6606

находящимся в плазматической мембране наружного сегмента палочек $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, K^+ -катионообменником.

Взаимодействуя с PDE, $\text{T}^*\text{-GTP}$ снимает ингибирующее воздействие PDE γ на фермент (рис. 8, IV), при этом для полной активации PDE необходимо присутствие двух молекул $\text{T}^*\text{-GTP}$ на молекулу фермента (по одной на каждую PDE γ -субъединицу). Активированная фосфодиэстераза (PDE*) гидролизует множество молекул cGMP (до трех тысяч молекул на молекулу активного фермента), и этот процесс является вторым этапом усиления зрительного сигнала (общий коэффициент усиления достигает $10^5 - 10^6$). Снижение внутриклеточной концентрации cGMP приводит к закрытию cGMP-зависимых катионных каналов и гиперполяризации плазматической мембраны (см. рис. 8, IV). Таким образом, за восприятие зрительного сигнала в НСП отвечает фоторецепторный пигмент родопсин. В процессе передачи сигнала на плазматическую мембрану принимают участие четыре белка: родопсин, трансдуцин, фосфодиэстераза cGMP и cGMP-зависимый катионный канал, а cGMP, являясь вторичным мессенджером, непосредственно передает сигнал с мембраны дисков на наружную плазматическую мембрану. Электрофизиологический ответ фоторецепторной клетки на световой стимул длится в течение сотен миллисекунд, а затем прекращается благодаря существованию в наружном сегменте палочек механизмов, ответственных за выключение фосфодиэстеразного каскада и восстановление темнового состояния.

ВЫКЛЮЧЕНИЕ ЗРИТЕЛЬНОГО КАСКАДА

После закрытия cGMP-зависимых каналов в цитоплазме палочки в результате активности $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, K^+ -катионообменника снижается концентрация катионов Ca^{2+} . Выключение зрительного каскада происходит в результате последовательного ряда реакций (рис. 9) и напрямую связано со снижением внутриклеточной концентрации катионов Ca^{2+} . Первой реакцией в этом процессе является фосфорилирование R^* , которое значительно уменьшает способность пигмента активировать трансдуцин. За фосфорилирование R^* в наружном сегменте палочек отвечает родопсинкиназа. Родопсинкиназа фосфорилирует только фотоактивированный R^* и не взаимодействует с родопсином в темноте. Активность родопсинкиназы регулируется Ca^{2+} -зависимым образом с помощью Ca^{2+} -связывающего белка – реверина. В темноте при высокой концентрации Ca^{2+} реверин предотвращает нежелательное фосфорилирование пигмента, в то время как снижение концентрации Ca^{2+} приводит к активации родопсинкиназы (рис. 9, II). У фосфорилированного R^* (R^*-P) появляется повышенное сродство еще к одному белку – аррестину. Связывание аррестина приводит к полной потере способности (R^*-P) активировать трансдуцин. Таким образом, для инактивации родопсина требуется его фосфорилирование и взаимодействие с аррестином. Инактивация $\text{T}^*\alpha\text{-GTP}$ происходит в результате гидролиза связанного GTP до GDP, причем $\text{T}\alpha$ сама обладает способностью гидролизовать GTP (ГТФазной активностью). Однако скорость самопроизвольного гидролиза довольно медленна. Она увеличивается при взаимодействии $\text{T}^*\alpha\text{-GTP}$ с $\text{PDE}\gamma$, а также

при снижении уровня cGMP в наружном сегменте. Недавно был открыт так называемый RGS-белок, относящийся к классу G-белков, который, взаимодействуя с $T^*\alpha$ -GTP, резко увеличивает скорость гидролиза GTP. После гидролиза GTP $T\alpha$ -GDP быстро диссоциирует от PDE γ , а ассоциация PDE γ с PDE* $\alpha\beta$ приводит к инактивации фермента (см. рис. 9, II). Процесс ассоциации ($T\alpha$ -GDP) с T $\beta\gamma$ контролируется еще одним белком – фосдуцином.

Снижение уровня свободного кальция в цитоплазме наружного сегмента, вызванное освещением, приводит также к активации гуанилатциклазы (GC*) – фермента, ответственного за восстановление темнового уровня cGMP. Действие Ca на GC в фоторецепторах опосредовано регуляторным GC-активирующим белком (GCAP). GCAP не влияет на базальную активность GC в присутствии Ca^{2+} , но увеличивает ее активность при понижении концентрации последнего. Снижение концентрации Ca^{2+} влияет также и на активность cGMP- зависимого катионного канала, и это влияние опосредовано еще одним Ca^{2+} -связывающим белком – кальмодулином. Таким образом, процесс выключения зрительного сигнала контролируется тремя Ca^{2+} -связывающими белками: рековерином, GCAP и кальмодулином.

ВОЗВРАЩЕНИЕ ФОТОРЕЦЕПТОРА В ТЕМНОВОЕ СОСТОЯНИЕ.

В результате снижения концентрации Ca^{2+} и последующего повышения концентрации cGMP в цитоплазме наружного сегмента открываются cGMP-зависимые катионные каналы (рис. 9, III) и восстанавливается темновой ток,

что и приводит к деполяризации фоторецептора. Наиболее сложным в процессе возвращения фоторецептора в темновое состояние является восстановление светочувствительности родопсина. Самой медленной реакцией является распад комплекса аррестина с фосфорилированным родопсином, который начинается с диссоциации полностью *транс*-ретинала. Далее свободный фосфорилированный опсин дефосфорилируется с помощью фосфатазы 2А (рис. 9, III), после чего, наконец, и становится возможной регенерация родопсина в результате связывания опсина с 11-*цис*-ретиналом (рис. 9, IV).

ЦВЕТНОЕ ЗРЕНИЕ

Как палочки, так и колбочки содержат светочувствительные пигменты — рецепторы светового излучения. Во всех палочках человека пигмент один и тот же; тогда как колбочки делятся на три типа, каждый из них со своим особым зрительным пигментом. Эти четыре пигмента чувствительны к различным длинам световых волн, и в случае колбочек эти различия составляют основу цветного зрения.

Акцептор цветного зрения (иодопсин) локализован в мембранной системе дисков колбочек. Как и у родопсина, у иодопсина хромофорной группой является ретиналь. Эти пигменты различаются лишь белковыми носителями — опсинами.

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

i_5b9bb6b3453d6606

тремя видами иодопсина. Убедительные доказательства существования трех различных зрительных пигментов (иодопсинов) получены с помощью микроспектрофотометрии одиночных колбочек сетчатки глаза. Оказалось, что все исследованные колбочки обладали одним из трех возможных спектров поглощения с максимумами при 445, 535 и 570 нм. При этом три дискретных класса спектров поглощения колбочек обусловлены не различной природой хромофора, а структурными особенностями белковых частей зрительного пигмента — их опсинами. Существование трех типов колбочек подтверждается также электрофизиологическими исследованиями, в которых регистрировалась спектральная чувствительность отдельных колбочек (спектры действия рецепторного потенциала). В этих экспериментах удалось выявить три типа клеток, различающихся по спектральной чувствительности.

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

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

i_5b9bb6b3453d6606

не только колбочек сетчатки.

ЗРЕНИЕ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

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

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

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

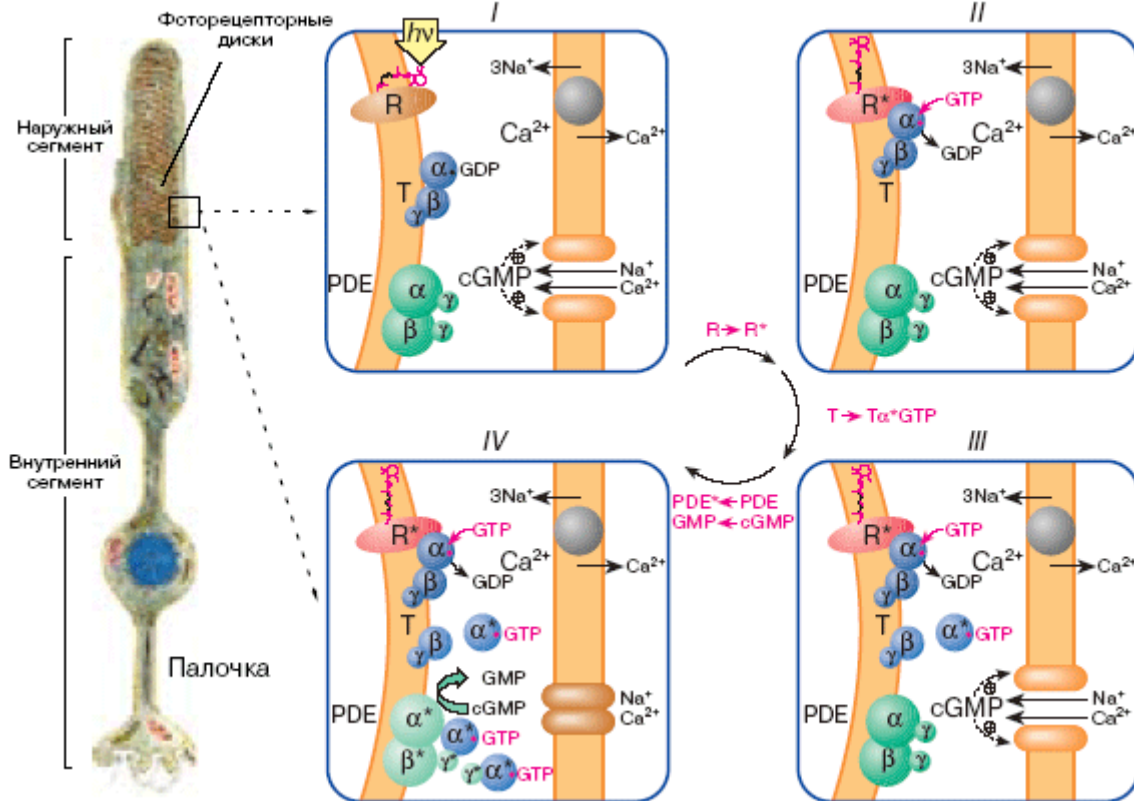
зрительная клетка переходит в сложное образование рабдомер, имеющий сравнительно небольшие размеры: 2 мкм в диаметре и 100 мкм в длину. В свою очередь рабдомеры объединены в компактную структуру — рабдом.

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

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

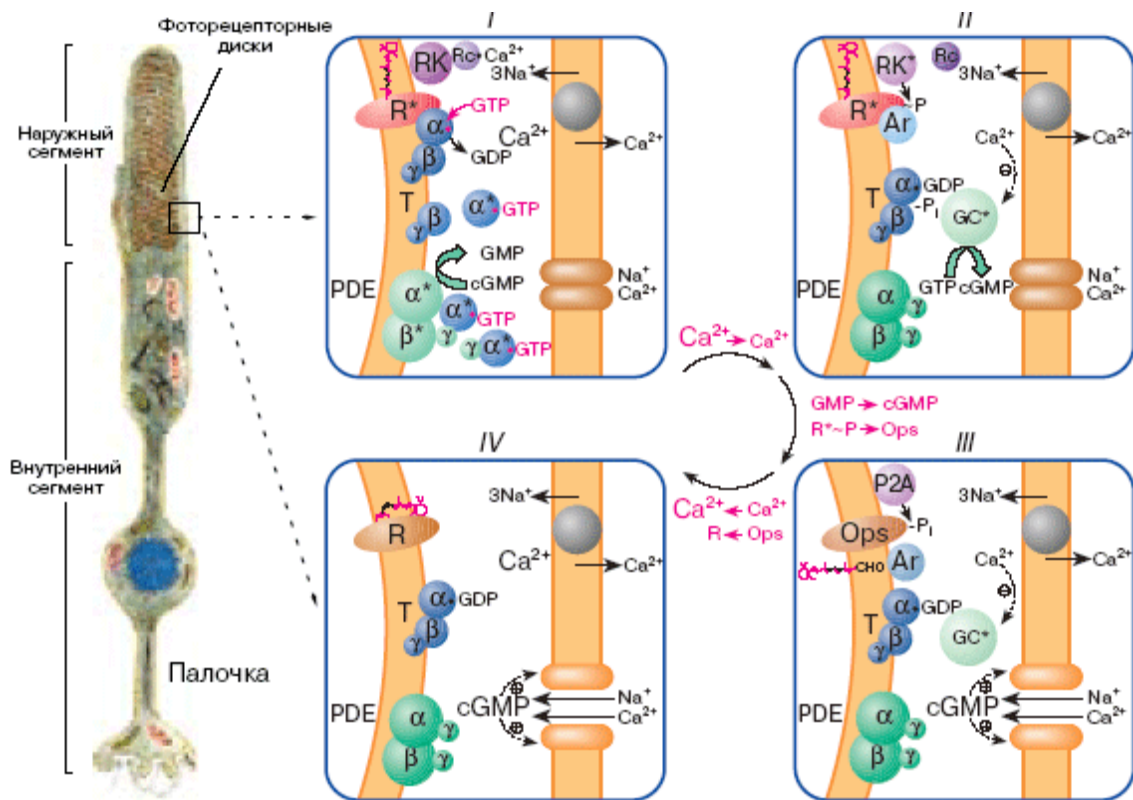
Хромофорами зрительных хромопротеидов исследованных видов насекомых служат каротиноидные производные ретиналя. Так, у домашней мухи выделен зрительный пигмент с максимумом поглощения при 437, а у пчелы — при 440 нм, причем биологически активный свет поглощается не только протетической группой хромопротеида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

Схема активации зрительного каскада:



- I – в темновом состоянии родопсин неактивен (R). a-Субъединица трансдуцина (T) находится в комплексе с GDP (Ta-GDP) и связана с димером b- и g-субъединиц (Tbg). cGMP- фосфодиестераза (PDE) – гетеротетрамер, состоящий из двух гомологичных каталитических a- и b-субъединиц (PDEab) и двух идентичных g- субъединиц (PDEg), являющихся внутримолекулярными ингибиторами фермента, неактивна. Гуанилатциклаза поддерживает высокий уровень cGMP в цитоплазме. cGMP-зависимые катионные каналы в плазматической мембране находятся в открытом состоянии, и катионы Na^+ и Ca^{2+} могут диффундировать из внеклеточного пространства в цитозоль. Внутриклеточная концентрация Ca^{2+} поддерживается на постоянном уровне находящимся в плазматической мембране $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, K^+ -катионообменником;
- II – в результате поглощения кванта света родопсин переходит в активное состояние ($\text{R} \rightarrow \text{R}^*$). Активный R^* связывается с трансдуцином и индуцирует обмен связанного с Ta GDP на GTP;
- III – комплекс R^* -(Ta-GTP)-Tbg диссоциирует на R^* , T и активный комплекс $\text{T}^*\text{a-GTP}$, после чего R^* способен активировать другую молекулу трансдуцина;
- IV – $\text{T}^*\text{a-GTP}$ активирует PDE. Активированная фосфодиестераза PDE^*ab гидролизует множество молекул cGMP. Снижение внутриклеточной концентрации cGMP приводит к закрытию cGMP-зависимых каналов, что влечет за собой гиперполяризацию плазматической мембраны.

Схема выключения зрительного каскада и возвращения фоторецептора в темновое состояние:



- I – фотоактивированное состояние НСП. Молекулы родопсина, трансдуцина и cGMP фосфодиэстеразы находятся в активном состоянии. cGMP-зависимый канал закрыт;
- II – в результате активности Na⁺/Ca²⁺, K⁺-катионообменника снижается внутриклеточная концентрация катионов Ca. Снижение концентрации Ca²⁺ приводит к активации родопсинкиназы (RK → RK*), которая фосфорилирует фотовозбужденный R*. Фосфорилированный родопсин (R*~P) прочно связывается с аррестином (Ar), который блокирует сайт взаимодействия родопсина с трансдуцином и тем самым делает невозможным дальнейшее образование T*α-GTP. T*α-GTP инактивируется в результате гидролиза GTP до GDP за счет внутренней GTP-азной активности Та и Та-GDP диссоциирует от PDEg. PDEg ассоциирует с каталитическими субъединицами PDE (PDE*ab) и инактивирует фермент;
- III – концентрация cGMP возрастает до темнового уровня за счет активации гунилатциклазы (GC*), происходящей в результате снижения концентрации Ca²⁺. cGMP-зависимый катионный канал открывается, что приводит к деполяризации плазматической мембраны. Фосфатаза 2А (P2A) дефосфорилирует R*~P. Дефосфорилированный родопсин распадается на полностью *транс*-ретиаль и опсин;
- IV – опсин ковалентно присоединяет 11-*цис*-ретиаль с образованием родопсина. Фоторецепторная клетка возвращается в исходное темновое состояние

ФОТОТАКСИС И ФОТОКИНЕЗ

ФОТОТАКСИС

Как и зрительные реакции, фототаксис относится к информационным фотобиологическим процессам. Под фототаксисом понимают фотоиндуцированные направленные движения свободных биологических объектов. Разумеется, приспособительные двигательные реакции высокоорганизованных животных, вызванные световыми сигналами (например, условные и безусловные рефлексы на свет), можно было бы также отнести к реакциям фототаксиса. Но под фототаксисом подразумевают 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. Фототаксис наблюдается также у внутриклеточных органелл, например у хлоропластов водорослей. В последнее время фототаксические реакции начали разделять на примитивные

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

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

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

Очень часто фототаксическая реакция одноклеточного организма усиливается с ростом интенсивности стимулирующего света. (нпр., положительный ответ эвглены пропорционален логарифму интенсивности

света)

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

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

В литературе обсуждаются возможные механизмы ориентации клеток при топофототаксисе. Каким же образом клетки детектируют направление света: измеряют ли градиент интенсивности света, проходящего через фоторецептор, или же поворачиваются, сравнивая интенсивности света, падающие на фоторецептор под различными углами?

Вероятно, что выбор направления к свету клетка водоросли осуществляет через измерение градиента интенсивности проходящего через рецептор света.

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

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

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

В пользу мембранной природы усилительных механизмов говорит следующее. Во-первых, все известные хромофоры так или иначе ассоциированы с клеточными мембранами (ФАД, фитохром, хлорофилл и др.). Во-вторых, фототаксические реакции очень чувствительны к мембранотропным веществам. Так, изменение соотношения интегрирующих

целостность мембран двухвалентных катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} сопровождается изменением даже знака фототаксиса. Изложенная мембранная гипотеза сближает усилительные механизмы таксиса и зрения, подчеркивая их органическое родство.

ФОТОКИНЕЗ

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

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

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

В настоящее время никаких данных о фотофизической и фотохимической стадиях этого процесса не имеется. Не ясны и конкретные темновые усилительные механизмы. Из исследований, проведенных Нульчем на пурпурных бактериях и сине-зеленых водорослях, следует, что ускорение движения скорее всего обусловлено генерацией АТФ в ходе фотосинтетического фосфорилирования, а не выделяющимся при

фотосинтезе кислородом, как это предполагалось ранее. Такой вывод сделан на основании тормозящего действия на кинез ингибиторов фотосинтетического фосфорилирования — диурана и дезаспидина.

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

ФОТОТРОПИЗМ

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

Фототропизм наблюдается у самых разнообразных представителей растительного мира: высших и низших растений, в том числе грибов и закрепленных на грунте водорослей, а также у свободно перемещающихся низших зооорганизмов (Bryozoa). Считается, что фототропизм проявляется только у растущих организмов, т. е. реализуется через различия в скоростях деления или увеличения размеров клеток на освещенной и затемненной сторонах растения. Действительно, были зарегистрированы различия в концентрациях гормона роста растений на затемненной и освещенной сторонах проростков овса. В некоторых работах изгибы рассматриваются как результат асимметрических перераспределений тургора в листовой подушечке вследствие игры осмотических потенциалов или изменения вязкости клеточной цитоплазмы.

Фототропные реакции у высших растений, как правило, характеризуются сложной зависимостью от интенсивности видимого света.

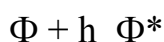
Рассмотрим, например, фототропную реакцию coleoptila овса. Выращенные в темноте проростки овса при освещении слабым «боковым» светом изгибаются по направлению к источнику. Угол изгиба пропорционален дозе (It) от 1 до 0,01 Дж/м² при облучении светом с длиной волны в области главного максимума спектра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

У низших растений (грибов и мхов) фототропно активными органами являются спорангиофоры, которые обнаруживают реакцию двух типов. Так, кратковременное (несколько секунд) освещение спорангиофор *Physcomyces* низкоинтенсивным светом ($\lambda = 450$ нм) приводит только к легкому и обратимому изгибу, а относительно продолжительное освещение (3—4 мин) вызывает положительный изгиб, который, увеличиваясь с ростом интенсивности света, может достигать 90°. Свойственный растениям отрицательный ответ у грибов и мхов при высоких интенсивностях света не наблюдается. У последних возникает так называемая фототропная индифферентность — насыщение фоточувствительной системы. Отрицательный изгиб можно вызвать только облучением ультрафиолетовым светом с $\lambda < 300$ нм. 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.

В многообразных фототропных ответах за поглощение биологически активного света ответствен скорее всего только один тип молекул.

В литературе рассматриваются две группы основных претендентов на роль хромофоров: каротиноиды и флавины. Флавиновые пигменты как хромофоры наиболее предпочтительны. Чрезвычайно важным в связи с этим является обнаружение с помощью электронной микроскопии в клетках проростков овса и спорангиофорах *Physcomyces* кристаллических телец, спектр поглощения которых близок к спектру поглощения кристаллического рибофлавина.

Предполагается следующая природа первичной фотохимической реакции фототропизма в клетке: флавины как универсальная редокс-система клеток фотовосстанавливаются, окисляя некий интермедиат, существенный для проведения дальнейших реакций по схеме:



В роли такого интермедиата могут выступать универсальные гормоны роста растений — ауксины. Предполагается, что возбужденные состояния флавинов сенсбилизируют деструкцию ауксинов, превращая их в 3-метилоксииндол.

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

Способность парафинового масла, взаимодействующего с

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

Наиболее вероятная схема событий, приводящих к конечному фототропному эффекту: свет электронно-возбужденные состояния флавинов сенсibilизированное окислительное декарбоксилирование индолилуксусной кислоты с образованием 3-метилоксииндола взаимодействие 3-метилоксииндола с белками мембран с модификацией их структуры нарушение транспорта ауксинов с появлением их бокового концентрационного градиента асимметричный рост клеток на освещенной и затемненной сторонах проростка изгиб проростка.

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

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 *a* 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.

ФИТОХРОМ

Фитохром представляет собой хромопротеид с молекулярным весом около 120 000. Выделенный из растения фитохром может существовать в двух взаимопревращающихся формах, обладающих длинноволновыми максимумами поглощения при 660 (P_{660} – красный свет) и 730 (P_{730} – дальний красный свет) нм и различающихся по своим физико-химическим свойствам.

За поглощение биологически активного света ответственны две формы фитохрома, а их взаимопревращение инициирует последующую цепь

событий.

Некоторые эффекты фитохрома: стимуляция всех макромолекулярных синтезов (ДНК, РНК, белок), системы биосинтеза хлорофилла, каротиноидов, антоцианов, органических фосфатов и витаминов (аскорбиновая кислота), ускорение катаболического распада полисахаридов, жиров и резервных белков, активирование клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях. На субклеточном и клеточном уровнях: стимуляция формирования пластид и ламеллярной (мембранной) структуры хлоропластов, деление и растяжение клеток.

МЕХАНИЗМЫ УСИЛЕНИЯ

Итак, все жизненно важные виды клеточного обмена (белкового, нуклеотидного, липидного, углеводного, энергетического) контролируются фитохромной системой.

Предполагаемый механизм действия фитохрома таков:

Фитохром приводит к кооперативным структурным перестройкам мембран, следствием которых являются скачкообразные изменения проницаемости мембран, конформации и функциональной активности различных ферментов

Фитохром, ассоциированный с мембраной, после превращения в активную форму меняет конформацию своего белкового носителя. Вслед за этим происходит генерализация локальных конформационных изменений по всей (или значительной части) мембранной системе клетки. Поскольку подавляющее большинство белков и других макромолекул (в том числе ДНК) входит в состав мембран или ассоциировано с ними, структурные перестройки мембран должны отразиться на их конформации, а

следовательно, и на их функциональной активности. Одновременно следует ожидать и модификации прямых функций мембран, т. е. проницаемости.

По-видимому, в клетке представлены два основных механизма усиления действия фитохрома: генетический и мембранный. Первый из них характерен для медленных, второй — для быстрых ответов, например для закрывания листочков у мимозы. Не исключено, что начальные стадии обоих путей идентичны и разветвление происходит где-то на последующих этапах. На основании сказанного можно представить себе следующую цепь событий (рис. X): свет фитохром фотохимическая модификация хромофора, сопровождающаяся конформационными изменениями в белковой части хромопротеида структурная перестройка мембраны с изменениями функциональной активности ферментов, проницаемости или с диссоциацией медиатора генетического аппарата биологический эффект.

ХРОНОБИОЛОГИЯ И ФОТОПЕРИОДИЗМЫ

Фотопериодизм — 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 онтогенезе. Они генетически детерминированы, т.к. 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). У многих организмов действие света на эндогенную ритмику реализуется не через аппарат зрительной фоторецепции. Этот тезис совершенно очевиден для бактерий и водорослей.

Вероятно, что в зависимости от таксономической принадлежности организмов эта функция отводится различным хромофорам.

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.

Существует ряд гипотез: 1) гормональная, связывающая биологический эффект с образованием в индукционном фотопериоде особого гормона цветения флоригена (смесь антезина и гиббереллина); 2) гипотеза эндогенных ритмов Бюннинга, основанная на взаимодействии биологических и астрономических часов; 3) ингибиторная гипотеза фотопериодизма, допускающая образование в растении при неблагоприятных

фотопериодических условиях особых ингибиторов цветения.

Однако ни одна из перечисленных гипотез не в состоянии объяснить сложность и многообразие фотопериодических ответов, и все они легко уязвимы для критики. Таким образом, до сих пор остается не ясной наиболее интригующая загадка фотопериодизма: почему при оптимальных для роста и развития внешних условиях растения короткого дня не зацветают на длинном дне и, наоборот, растения длинного дня — на коротком.

ФОТОПЕРИОДИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ У ЖИВОТНЫХ

Разнообразные фотопериодические реакции зарегистрированы для членистоногих (насекомые, клещи), червей, рыб, птиц, млекопитающих и других систематических групп животного мира. Продолжительность дня регулирует в основном процессы, связанные с размножением и эмбриональным развитием (например, диапауза у насекомых, серебристо-черных лисиц), приспособительными реакциями к сезонным условиям (линька у птиц и млекопитающих, рост меха, перелеты птиц, впадение в спячку и т. д.), а также многие другие физиологические, метаболические, морфологические параметры организмов, включая и направленные изменения внутриклеточных органелл.

Механизмы фотопериодических реакций у животных до сих пор не выяснены. На сегодняшний день определенно нельзя даже сказать, с помощью каких органов животные воспринимают фотопериодически активный свет. Наиболее логично было бы думать, что за рецепцию света ответственны органы зрения. Если это так, то спектр действия фотопериодизма должен совпадать со спектром действия зрения (акцепторы

света — родопсин и иодопсины). Однако имеется целый ряд фактов, противоречащих этому. Так, гусеницы дубового шелкопряда сохраняли способность давать диапаузирующие куколки даже в том случае, когда их органы зрения (стеммы) выжигались или покрывались светонепроницаемым лаком. Аналогичные результаты получены для колорадского жука и для тли *Megoura*. В опытах Лиса по освещению различных участков тела *Megoura* было обнаружено, что только голова насекомого чувствительна к свету. С помощью микропучков света диаметром менее 50 мкм установлена локализация наиболее чувствительных участков на голове: они располагались по ее центру между глазами. Циммерман и Айвес сравнили спектральную чувствительность сложного глаза и ритма вылупливания яиц у *Drosophila pseudoobscura* и обнаружили их заметное расхождение. Сигнал на электроретинограмме индуцировался светом с длиной волны более 600 нм, в то время как длинноволновая граница спектра действия ритма вылупливания находится в области 540 нм.

Аналогичные опыты были проведены и на белоглазом мутанте *Drosophila*, чувствительность глаза которого на три порядка выше, чем у дикого типа. Спектр действия ритма вылупливания у обоих типов мухи практически совпал.

В изящных экспериментах Вильямса и Адкиссона установлено, что экстраретинальные рецепторы, ответственные за терминацию диапаузы шелкопряда, расположены в мозгу. (После трансплантации мозга из головы на верхушку живота для получения биологического ответа необходимо было освещать уже не голову, а живот.)

На основании своих опытов Вильяме и Адкиссон пришли к выводу, что насекомые способны воспринимать свет непосредственно мозгом с помощью специальных фоточувствительных нейронов.

Аналогичный вывод был сделан и П. Ф. Беловым, обнаружившим, что ослепленные гусеницы дубового шелкопряда воспринимают свет светочувствительными нервными клетками осязательных волосков (сенсиллы).

Значительное число работ по экстраретинальной рецепции выполнено на ракообразных. Например, показано, что у краба освещение шестого (но не других) абдоминального ганглия вызывает появление спайковой активности в нервных волокнах хорды. Оказалось, что в состав этого ганглия входит пара фоторецептивных нейронов, содержащих пигмент, близкий к родопсину.

Способностью к экстраретинальной рецепции света обладают и представители всех пяти классов позвоночных.

Например, свет, направленный на мозг через глазное отверстие после энуклеации глаза, в равной мере стимулирует развитие половых желез как у оперированных, так и у нормальных животных.

У новорожденных крысят рецептором фотопериодически активного света служит железа Харднера, располагающаяся рядом с глазами.

В опытах, выполненных на птицах, было обнаружено, что стимуляция развития гонад может быть вызвана нанесением на череп радиолюминесцентной краски без использования световых периодических воздействий. Установлено, что экстраретинальные фоторецепторы хирургически ослепленных воробьев обладают очень высокой

чувствительностью: для изменения циркадной ритмики двигательной активности были достаточно низкие световые потоки (1 лк), сравнимые с освещенностью, создаваемой луной.

На основании ряда данных сделано заключение о локализации фоторецептора у птиц в специальной мозговой железе — эпифизе. Интересно в связи с этим отметить, что в эволюционном плане эпифиз иногда рассматривается как рудиментарный третий глаз на «затылке»; которым когда-то располагали предки современных животных (следовательно, и человека). Приведем некоторые факты.

Условия освещения сильно влияют на морфологические, гистологические и функциональные характеристики эпифиза позвоночных. В частности, в нем регистрируются согласованные с экзогенной световой ритмикой периодические изменения содержания гормонов. Хирургическое удаление эпифиза приводит к сглаживанию или даже исчезновению суточных ритмов гормонов других желез внутренней секреции. Имеются данные о том, что эта же мозговая железа внутренней секреции принимает активное участие в реализационных, физиологических стадиях фотопериодических реакций и у позвоночных животных.

По-видимому, у птиц, как и у млекопитающих, одним из важных медиаторов фотопериодических реакций является эпифизарный гормон — мелантоин. У беспозвоночных (насекомые) фотопериодические реакции также связаны с гормональными эффектами, в которых принимает участие гормон роста — экдизон. Следует также отметить, что кроме желез внутренней секреции функции экстраретинального рецептора у амфибий,

рептилий и новорожденных птиц могут выполнять светочувствительные клетки кожи.

Приведенные выше данные о прямой внутримозговой и кожной рецепции света вовсе не означают, что глазное зрение не причастно к фотопериодическим реакциям. По-видимому, у животных представлены две параллельно и взаимосогласованно действующие фоторецепторные системы, удельный вес которых зависит от таксономической принадлежности, возраста и физиологического состояния организмов. Известно, например, что и у слепых людей суточный ритм содержания кортизола в крови имеет циркадный характер.

Соотношение между зрительной и экстраретинальной рецепцией в управлении ритмичной двигательной активности птиц хорошо прослеживается на воробьях. Хотя световая подстройка суточной активности осуществляется и без участия глаз, остановка циркадных ритмов непрерывным мощным светом не наблюдается у ослепленных воробьев даже при использовании световых потоков, в $2 \cdot 10^5$ раза превышающих чувствительность экстраретинального рецептора. Вместе с тем фотопериодический контроль системы размножения воробьев (например, размеры гонад) осуществляется только за счет экстраретинальной мозговой рецепции.

В итоге исследования различных фотопериодических ответов у воробьев было сформулировано положение о существовании трех типов реакций, которые реализуются с участием только мозговых, только зрительных, мозговых + зрительных рецепторов.

Что же известно о природе хромофоров, ответственных за инициацию

фотопериодических реакций? Учитывая, что точное определение фотопериодических спектров действия представляет собой весьма сложную методическую задачу, многие исследователи ограничивались сопоставлением действия немонахроматического света различного спектрального состава. Так, для насекомых наиболее эффективным оказался не красный, а синий свет, а для фотопериодической регуляции онтогенеза птиц — желто-красный (600 нм), но не зеленый (520 нм). Более или менее точный спектр действия прерывания диапаузы тли был измерен Лисом. Максимум спектра действия этого процесса расположен при 450—470 нм. Сходный спектр действия с максимумом при 440—450 нм характерен для прерывания диапаузы личинки яблоневой плодовой жорки. В аналогичном спектре действия для личинок комара обнаруживается максимум при 540 нм. Наконец, спектр действия увеличения семенников у уток представлен широкой полосой в области 600—740 нм.

В рецепции фотопериодически активного света кроме органов зрения могут участвовать клетки головного мозга и нервных ганглиев, а также фоточувствительные дериваты поверхности кожи. Что касается механизмов биологического усиления фотопериодических стимулов, то, несмотря на отсутствие точных данных, следует согласиться с высказываемыми различными авторами предположениями, что в их основе лежит сложная цепь нервнорефлекторных и гуморальных реакций.