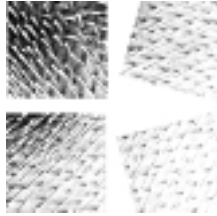


# Фоторегуляторные и фотодеструктивные процессы



## § 1. Механизмы фоторегуляторных реакций фитохрома

Действие света на растительные и микробные организмы не ограничивается фотосинтезом. Существует большое количество других, прямо не связанных с фотосинтезом фотобиологических процессов, среди которых в первую очередь следует выделить процессы фоторегуляции. В отличие от фотосинтеза они не участвуют непосредственно в запасании энергии квантов света. Однако фоторегуляторные системы выполняют весьма важную функцию, регулируя многие стороны жизнедеятельности организмов.

Особенностью фоторегуляторных систем является их высокая квантовая чувствительность, сочетающаяся с большой эффективностью биологического действия. Это обусловлено триггерным принципом действия систем фоторегуляции: здесь свет служит только сигналом, запускающим сложную цепь последовательных биохимических изменений, приводящих в конечном результате к определенному фотобиологическому эффекту. Триггерный механизм действия света лежит в основе таких известных фоторегуляторных процессов, как фотоморфогенез, фототропизм, фотопериодизм, фототаксис, фотоиндуцированный биосинтез пигментов и ряд других.

Любой фоторегуляторный процесс включает несколько последовательных стадий: поглощение кванта света и образование электронно-возбужденного состояния фоторецептора; фотофизическую реализацию энергии возбуждения и сенсibilизацию фотохимической реакции; образование промежуточных фотопродуктов и конечное проявление фотобиологического эффекта. □

Идентификация природы пигментов-сенсibilизаторов — первоочередная задача при изучении механизмов фоторегуляторных реакций. Однако пигменты-сенсibilизаторы большинства фоторегуляторных процессов до сих пор не идентифицированы и о природе их судят только по спектрам действия фотобиологических эффектов. Исключение составляет фитохром — пигмент, характеризующийся универсальностью распространения среди растительных организмов. Именно благодаря открытию этого пигмента в изучении механизмов фоторегуляторных реакций достигнут значительный прогресс. Закономерности функционирования фитохромной системы имеют во многом общий характер с другими фоторегуляторными системами.

Фитохром — хромопротеин. Его оптические свойства и способность выполнять функцию фоторецептора обусловлены хромофором — линейным тетрапирро-

лом (или билитриеном). Взаимодействие между хромофором и белковой частью пигмента имеет важное значение, поскольку от этого зависит характерное свойство фитохрома — его фотообратимость и наличие двух взаимопревращающихся форм. Одна форма обладает длинноволновым максимумом поглощения при 660 нм ( $\Phi_{660}$ ), а другая — при 730 нм ( $\Phi_{730}$ ). Переход одной формы фитохрома в другую индуцируется красным (660 нм) и дальним красным (730 нм) светом:



Спектры действия прямой и обратной фотоконверсии фитохрома близко совпадают со спектрами поглощения  $\Phi_{660}$  и  $\Phi_{730}$ , соответственно. При этом квантовый выход реакции  $\Phi_{660} \rightarrow \Phi_{730}$  примерно в 1,5 раза выше, чем реакции  $\Phi_{730} \rightarrow \Phi_{660}$ .

Молекула фитохрома является димером, в котором каждый из мономеров с молекулярной массой около 124 кДа содержит хромофор, присоединенный к цистеину апобелка тиоэфирной связью. К настоящему времени выявлено несколько типов фитохромов ( $A-E$ ), различающихся по структуре апобелка, но содержащих один и тот же хромофор — фитохромобилин. Предполагается, что хромофор формы  $\Phi_{660}$  расположен в гидрофобном белковом кармане.

Между ароматическими аминокислотными остатками белкового носителя и билитриеновой группировкой фитохрома протекают процессы индуктивно-резонансной миграции энергии. Эффективность переноса энергии электронного возбуждения составляет 30–35%, причем ультрафиолетовый свет, поглощаемый белком, активен как для протекания прямой ( $\Phi_{660} \rightarrow \Phi_{730}$ ), так и обратной ( $\Phi_{730} \rightarrow \Phi_{660}$ ) реакции. Установлено, что энергия электронного возбуждения переносится с триплетного уровня триптофановых остатков в белке на синглетный возбужденный уровень билитриена, о чем свидетельствует появление его замедленной флуоресценции.

Прямая и обратная фотоконверсия фитохрома — многоступенчатые процессы, включающие в себя образование и распад ряда спектрально различных интермедиатов, которые зарегистрированы методом флеш-фотолиза при низких температурах. Индуцированные красным светом изменения в хромофор-белковом взаимодействии приводят к длинноволновому смещению максимумов в спектрах поглощения интермедиатов в направлении от 660 к 730 нм. Обратное фотопревращение также протекает через промежуточные формы, однако, спектрально отличающиеся от таковых при прямом фотопревращении.

Фототрансформацию фитохрома можно разделить на две фазы. Первичная фотохимическая реакция происходит в наносекундном временном диапазоне и заключается в фотоиндуцированной  $Z-E$  изомеризации фитохромобилина относительно двойной связи при  $C_{15}$  между  $C$  и  $D$  кольцами и, вероятно, повороте хромофора вокруг тиоэфирной связи. В работах В. А. Синещекова зарегистрирована флуоресценция нативной красной формы фитохрома с максимумом излучения в области 682–687 нм. Квантовый выход флуоресценции фитохрома при комнатной температуре очень низок ( $\approx 5 \cdot 10^{-3}$ ), что указывает на преимущественную дезактивацию его синглетного возбужденного состояния не по излучательному, а по фотохимическому пути в фотореакции изомеризации.

Последующие темновые перегруппировки занимают миллисекунды и приводят белковую часть фитохрома в соответствие с новой конформацией хромофора. В ре-

в результате такой фотоиндуцированной перестройки образуется дальнекрасная форма фитохрома ( $\Phi_{730}$ ) с гидрофобной белковой зоной, которая может взаимодействовать с регуляторными и сигнальными молекулами (Рис. XXX.1).

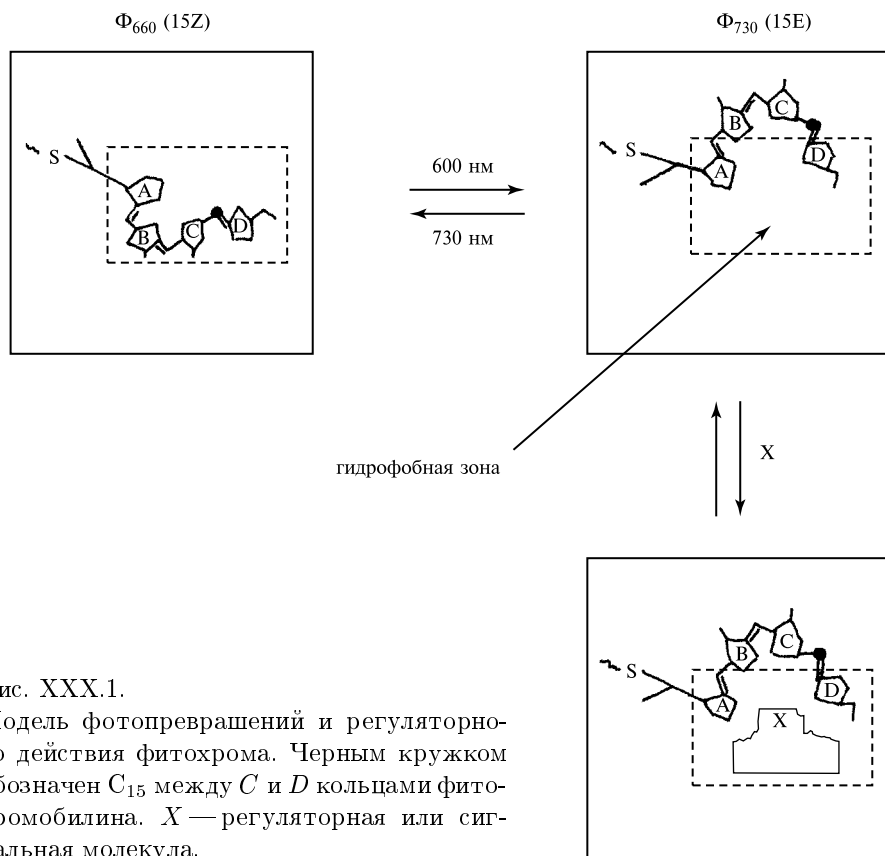


Рис. XXX.1.

Модель фотопревращений и регуляторного действия фитохрома. Черным кружком обозначен  $C_{15}$  между  $C$  и  $D$  кольцами фитохромобилина.  $X$  — регуляторная или сигнальная молекула.

Конформационные перестройки белка при фотоконверсии фитохрома подтверждаются данными иммунохимического анализа, изменениями в спектрах кругового дихроизма в интервале 200–300 нм и появлением разностных спектров поглощения между формами  $\Phi_{660}$  и  $\Phi_{730}$  в области 210–300 нм. Вместе с тем конформационные перестройки белка отличаются от денатурационных, поскольку энтропия активации промежуточных стадий фотоконверсии фитохрома невелика ( $\Delta S^* \sim 25$  э. е.). □

С фотоиндуцированным образованием физиологически активной формы фитохрома связаны многообразные изменения в метаболизме, активности ферментов, движениях, росте и дифференциации растений. Доказательствами зависимости физиологической реакции от фитохрома могут служить спектр действия этой реакции с максимумом при 660 нм и обратимость эффекта при последовательном

чередовании периодов освещения красным и дальним красным светом. Некоторые из фитохром-индуцированных процессов протекают быстро, другие обладают лаг-фазой после фотоконверсии  $\Phi_{660} \rightarrow \Phi_{730}$ .

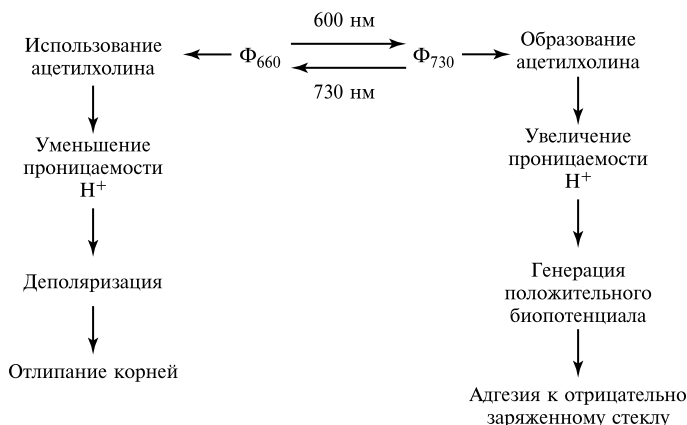


Рис. XXX.2.

Участие ацетилхолина в реакции адгезии, индуцируемой фитохромом ( $\Phi$ )

Совокупность полученных к настоящему времени экспериментальных данных свидетельствует о том, что «быстрые» процессы обусловлены индуцированными  $\Phi_{730}$  структурными перестройками мембран. Косвенно на это указывают опыты, в которых при активации фитохромной системы выявлены изменения проницаемости клеточных мембран для ионов, электрического потенциала и адгезивных свойств поверхности растительных клеток. Так, в экспериментах с изолированными корешками проростков фасоли показано, что облучение корней красным светом приводит к развитию положительного биоэлектрического потенциала, тогда как при последующем воздействии дальним красным светом возникает отрицательный биопотенциал. Фотоиндуцированное образование биоэлектрических потенциалов сопровождалось обратимой адгезией корней к отрицательно заряженному стеклу. При этом кинетические характеристики обоих процессов близко совпадали, а сами процессы характеризовались достаточно высокой скоростью протекания.

На основании полученных данных сделан вывод о том, что реакции адгезии связаны с фотоиндуцированным изменением проницаемости мембраны и образованием в ней электрохимического градиента в результате изменений ионных потоков в клетках корней. Поскольку оказалось, что этим процессам предшествует изменение в клетках концентрации ацетилхолина, было выдвинуто предположение о медиаторной функции данного гормона. Подтверждением такой точки зрения явились результаты экспериментов, в которых были обнаружены фотомиметические свойства ацетилхолина: экзогенный ацетилхолин заменял действие красного света, усиливая поток  $H^+$  и вызывая реакцию адгезии корней. Представления о роли ацетилхолина в индукции «быстрых» фитохромзависимых реакций отражены на рис. XXX.2.

∇ Индуцируемые фитохромом изменения свойств мембран растительной клетки объясняют, исходя из данных о его ассоциации с определенными участками поверхности мембраны. Таким образом, фитохром можно рассматривать в качестве специфического фоторегуляторного лиганда, а участок поверхности мембраны, с которым он связывается, — в качестве ее рецептора. □

Наряду с индукцией «быстрых» реакций фитохромная система регулирует большое количество биохимических и физиологических процессов, для реализации которых требуются несколько часов и более длительные промежутки времени. Установлено, что в основе механизма участия фитохромной системы в этих так называемых «медленных» процессах лежит индуцированное пигментом  $\Phi_{730}$  активирование генов. Считают, что каждая дифференцированная клетка содержит полный набор генов, которые по отношению к свету подразделяются по крайней мере на три функциональных типа: активные гены, транскрибирующиеся одинаково в темноте и на свету; неактивные гены, не транскрибирующиеся ни в темноте, ни на свету; «потенциально активные» гены, активирующиеся фитохромом. Форма  $\Phi_{730}$  через определенные медиаторы гормональной природы включает «потенциально активные» гены, что приводит к синтезу молекул РНК и ферментов, определяющих направленность той или иной морфогенетической реакции.

Анализ закономерностей проявления «быстрых» и «медленных» процессов, регулируемых фитохромной системой, позволяет предположить, что на первичных стадиях они реализуются по общему механизму, в основе которого лежат индуцированные  $\Phi_{730}$  конформационные перестройки мембран. Действительно, изменение проницаемости мембран в результате их конформационных перестроек может облегчить доступ фитогормонов и других важных метаболитов к ДНК, и тем самым вызвать депрессию генов.

Одним из возможных путей реализации регуляторной функции фитохрома может быть взаимодействие хромофора формы  $\Phi_{730}$  со специфическими протеинкиназами и ингибирование их активности. Известно, что последовательные реакции дефосфорилирования и фосфорилирования белков играют важную роль в усилении и передаче внутриклеточных сигналов.

Интересной особенностью фитохрома является его способность к образованию димеров. С использованием моноклональных антител показано существование как  $\Phi_{660} : \Phi_{660}$  и  $\Phi_{730} : \Phi_{730}$  гомодимеров, так и  $\Phi_{660} : \Phi_{730}$  гетеродимеров фитохрома. Предполагается, что именно образование менее стабильных гетеродимеров и их быстрая обратная темновая конверсия лежат в основе опосредуемых фитохромом ответов на низкие интенсивности света.

Выше было показано, что первичная фотохимическая реакция фитохрома сопровождается конформационными изменениями белковой части пигмента. Очевидно, именно это свойство фитохрома является определяющим в механизме его регуляторного действия на структурное состояние мембран и активность ферментов. Аналогичным свойством обладает и ряд других фоторецепторных систем, например зрительный пигмент родопсин и светочувствительная система голохром — протохлорфиллид. Последняя участвует в контроле за формированием хлоропластов высших растений и некоторых зеленых водорослей. Поглощение красного света вызывает гидрирование протохлорфиллида, разрушение комплекса голохром —

протохлорофиллид, высвобождение белка голохрома с последующим изменением его конформации и кооперативной перестройкой проламеллярной структуры пластиды. Эти реакции сопровождаются индуцированным биосинтезом белка, различных пигментов и компонентов ЭТЦ фотосинтеза.

## § 2. Другие фоторегуляторные реакции

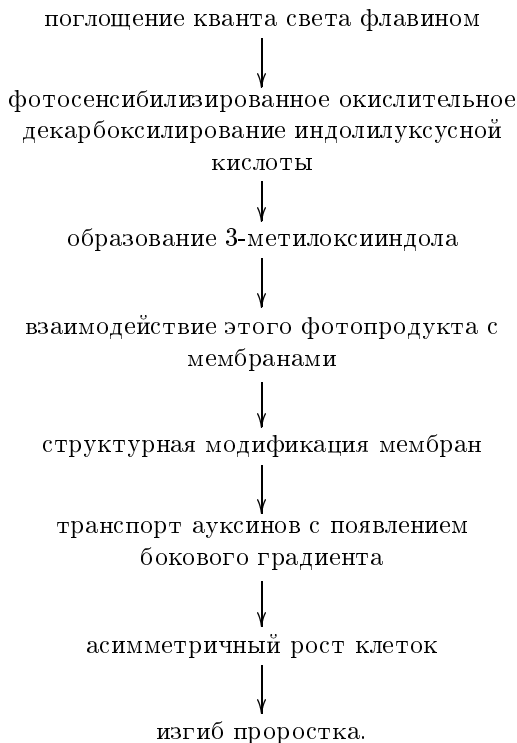
В настоящее время первичные механизмы действия некоторых фоторецепторов фоторегуляторных реакций подтверждены модельными экспериментами, в которых установлена способность ряда простых органических молекул (фотохромы) при поглощении квантов света эффективно изменять активность ферментов и проницаемость мембран. Видимо, молекула фотохрома образует комплекс с ферментом, что позволяет рассматривать его как фотохром-протеин. Поглощая квант света, молекула фотохрома претерпевает фотохимическую реакцию (например, цис-транс-изомеризации), приводящую к изменению пространственной конфигурации фотохрома, что отражается на характере взаимодействия фотохрома с ферментом. Таким образом, общим свойством фотохромных молекул является их способность изменять активность фермента за счет непосредственного пространственно-структурного взаимодействия с его активным или аллостерическим центром. При встраивании фотохромных молекул в искусственную мембрану удается наблюдать фотоиндуцированные изменения таких ее свойств, как проницаемость и мембранный потенциал. Существенно меняется и строение мембраны. Так, одна молекула красителя хризофинина, встроенного в искусственную мембрану из полигидроксиэтилметакрилата, при поглощении кванта света индуцирует структурные перестройки, захватывающие несколько сотен молекул мономеров.

В клетках функцию фотохромов могут выполнять различные соединения, каждое из которых характеризуется строго индивидуальным спектром поглощения, поэтому наблюдается большое разнообразие спектров действия фоторегуляторных реакций. Максимумы в спектрах действия фоторегуляторных процессов, рассмотренных выше, расположены в красной области спектра. Вместе с тем существует ряд процессов, в проявлении которых наибольшей эффективностью обладает свет синей области спектра.

Характерным примером такого рода процессов является фототропизм, определяемый как индуцированное односторонним освещением искривление верхушки надземных частей растений. Фототропические реакции характеризуются исключительно высокой квантовой чувствительностью: заметные изгибы наблюдаются уже при дозах синего света, составляющих  $\sim 10^{-3}$  Дж/м<sup>2</sup>. Фототропические изгибы обусловлены различиями в скоростях деления клеток на освещенной и затемненной сторонах растения, что, в свою очередь, связано с фотоиндуцированным созданием бокового градиента гормона роста — ауксина. Спектры действия фототропических реакций позволяют предполагать, что основными рецепторами биологически активного света являются флавиновые хромофоры, способные сенсibilизировать фотоокисление ауксина. Действительно, в модельных опытах обнаружено фотосенсibilизированное рибофлавином окисление молекул ауксина с квантовым выходом  $\simeq 0,7$ . В то же время показано, что само фоторазрушение ауксинов не может создать необходимый градиент гормона. Предполагают, что такой градиент

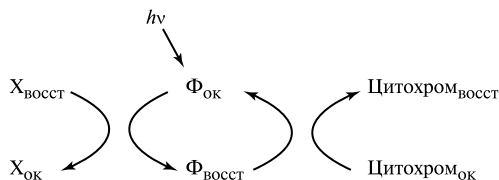
возникает, в основном, за счет изменения проницаемости мембран при их структурной модификации продуктами фотолиза ауксина. В пользу такой точки зрения косвенно свидетельствуют данные о способности одного из фотопродуктов ауксина (3-метилоксииндол) имитировать фототропный эффект.

В соответствии с описанными данными предложена такая последовательность реакций, приводящих к фототропическому эффекту:



□

Другим типичным «ответом на синий свет», который может сенсibilizироваться флавиновыми фоторецепторами, является фотоиндуцированный каротиногенез. Согласно имеющимся данным, фоторецептор (флавопротеин) при поглощении кванта света переходит из окисленного состояния ( $\Phi_{\text{ок}}$ ) в восстановленное ( $\Phi_{\text{восст}}$ ), что сопровождается окислением какого-то соединения, служащего донором электрона (X). В темноте фотовосстановленный флавопротеин может быстро реагировать с акцепторами электрона (наиболее вероятно — цитохромами) и переходить в исходное окисленное состояние:



Фотохимическая активность флавиновых хромофоров обусловлена их переходом под действием света из основного в возбужденное синглетное, а затем триплетное состояние, отличающееся высокой каталитической активностью. Поскольку время жизни флавина в триплетном состоянии при комнатной температуре составляет  $\sim 20$  мкс, а в синглетном — лишь 2,3 нс, предполагают, что именно триплетный флавин участвует в реакции молекулярной фотосенсибилизации на первичной стадии фотоиндуцированного каротиногенеза.

Еще один тип фотобиологических процессов, также индуцируемых синим светом, составляет большая группа реакций фоторегуляции движения микроорганизмов, называемых фототаксисом.

Фототаксис определяется как способность микроорганизмов регулировать уровень своей освещенности путем перемещения и аккумуляции в области пространства с оптимальными световыми условиями, где обеспечивается максимальная скорость фотосинтеза при минимальном повреждающем действии света. Различают несколько типов фоторегуляции движения микроорганизмов (например, фотокинез, фотофобная реакция), из которых наиболее эффективным и совершенным является истинный фототаксис, обеспечивающий перемещение клетки параллельно световым лучам. В этом случае для детектирования направления распространения света движущиеся водоросли (например, двужгутиковые хламидомонады) используют анизотропию поглощения света фоторецептором, локализованным в плазматической мембране клетки. Под фоторецептором внутри хлоропласта расположена стигма, состоящая из группы липофильных гранул, функция которой, как предполагается, и сводится к обеспечению анизотропии поглощения света фоторецептором.

С использованием специально разработанной методики экстраклеточной регистрации потенциалов удалось обнаружить и исследовать фотоэлектрические реакции, связанные с рецепцией и преобразованием светового стимула при фототаксисе (О. Синещеков, Ф. Литвин). Последовательность таких реакций на плазматической мембране включает первичный, градуально зависящий от интенсивности света электрический ответ — фоторецепторный потенциал фототаксиса, пороговую регенеративную реакцию и последующие медленные изменения разности потенциалов. На основании анализа результатов фотоэлектрических измерений и регистрации двигательной активности жгутиков водоросли предполагается, что градуальный фоторецепторный потенциал непосредственно контролирует движение жгутиков при фотоориентации, тогда как регенеративная электрическая реакция вовлекается в пороговый фотофобный ответ клетки при резком изменении освещенности. Что касается медленных изменений трансмембранного потенциала, то они, по-видимому, отражают адаптацию фоторецепторной системы к измененному уровню освещенности.

Полученные спектры действия фототаксиса позволяют рассматривать в качестве наиболее вероятных кандидатов на роль первичных фоторецепторов флавиновые пигменты. Вместе с тем имеются данные, указывающие на возможную пигментную гетерогенность фоторецептора фототаксиса. Предполагается, что функционирование такого фоторецептора включает процесс миграции энергии с его антенной части на «реакционный центр», концентрация которого относительно мала. Судя по спектру действия фотоиндукции рецепторного потенциала фототаксиса



у жгутиковой водоросли *H. pluvialis*, имеющего отчетливо выраженную структуру с 6 максимумами в диапазоне 400–600 нм, «реакционный центр» фоторецептора может представлять собой молекулы типа бактериальных родопсинов.

### § 3. Общая характеристика фотодеструктивных процессов

К фотодеструктивным процессам относятся инициируемые светом в молекулах биосубстрата реакции, приводящие к образованию таких химических изменений молекул, которые сопровождаются нарушением или даже полной потерей их функциональных свойств и в конечном счете обуславливают проявление повреждающих эффектов на клеточном и организменном уровнях.

Фотодеструктивные реакции наиболее эффективно индуцируются в биологических системах коротковолновым ультрафиолетовым (УФ) излучением (< 290 нм), что связано с прямым поглощением этого излучения нуклеиновыми кислотами, белками и некоторыми другими биологически важными внутриклеточными компонентами. Вместе с тем при определенных условиях фотодеструктивные процессы могут протекать и под действием света более длинноволнового диапазона оптического спектра, который подразделяется на три области: средневолновую УФ (290–320 нм), длинноволновую УФ (320–400 нм) и видимую (400–700 нм). В отличие от коротковолнового УФ-излучения, поглощаемого озоном атмосферы, эти виды оптического излучения достигают поверхности Земли и, следовательно, являются экологическими компонентами солнечной радиации.

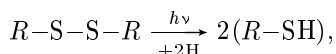
Длинноволновое УФ-излучение и видимый свет практически не поглощаются нуклеиновыми кислотами и белками. Поэтому инициация в них деструктивных реакций при действии этих видов оптического излучения осуществляется преимущественно с участием других молекул, выступающих в качестве первичных фоторецепторов. Такие вещества называются фотосенсибилизаторами, а процессы, в которых они участвуют, — фотосенсибилизированными.

Известно несколько типов первичных фотохимических превращений молекул, ответственных за деструктивное действие оптического излучения. К ним относятся реакции фотоокисления, фотоионизации, фотодиссоциации и фотоприсоединения.

Реакции фотоионизации, фотодиссоциации и фотоприсоединения наиболее часто протекают в белках и нуклеиновых кислотах при их облучении коротковолновым УФ-светом. Основной первичной фотореакцией при УФ-фотолизе остатков триптофана (АН) в белках является его фотоионизация с образованием катион-радикала (АН<sup>+</sup>) и сольватированного электрона ( $e_s^-$ ):



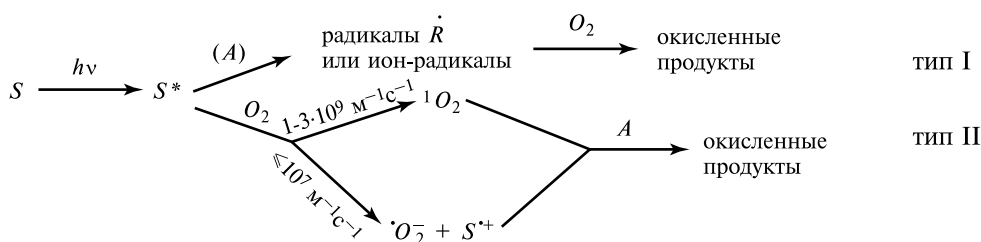
В цистиновых остатках белков первичная фотохимическая реакция заключается в фотодиссоциации S–S-связей:



т. е. фотолиз цистина идет через стадию свободных радикалов с локализацией неспаренного электрона на атоме серы.

В отличие от белков, в нуклеиновых кислотах фотоионизация азотистых оснований происходит только при поглощении двух квантов УФ-света. Такие двухквантовые реакции удается наблюдать при использовании высокоинтенсивного импульсного лазерного УФ-излучения. При относительно низких же интенсивностях УФ-света основными фотохимическими реакциями, в которые вступают основания нуклеиновых кислот, являются реакции фотоприсоединения — димеризация, гидратация и образование (6-4) пиримидиновых аддуктов.

Фотосенсибилизированные деструктивные реакции в большинстве случаев протекают с участием кислорода. Эти процессы, получившие название фотодинамических, по своему механизму разделяют на два типа в зависимости от того, каким способом энергия светового возбуждения передается от сенсибилизатора к биологическому субстрату. Они могут быть представлены в виде следующей общей схемы:



где  $S^*$  — возбужденный фотосенсибилизатор, подвергающийся первичным изменениям,  $S^+$  — окисленная форма сенсибилизатора,  $A$  — молекула биосубстрата, участвующая в реакции на последующей стадии.

В реакциях типа I фотовозбужденный сенсибилизатор может вступать в окислительно-восстановительные реакции с различными биологически важными молекулами, участвуя в переносе электрона либо атома водорода. В результате образуются реакционноспособные радикалы (и/или ион-радикалы) сенсибилизатора и молекул биологического субстрата, вступающие в дальнейшие химические реакции с кислородом.

В фотодинамических реакциях типа II происходит перенос энергии от возбужденной в триплетное состояние молекулы сенсибилизатора к кислороду с образованием его электронно-возбужденной формы  $^1O_2$ ; образовавшийся синглетный кислород затем окисляет молекулы биологического субстрата. С меньшей эффективностью некоторые триплетные сенсибилизаторы способны осуществлять одноэлектронное восстановление молекулярного кислорода с образованием супероксидного анион-радикала  $\dot{O}_2^-$ .

Наряду с фотодинамическими деструктивными процессами известны механизмы фотосенсибилизации, не требующие участия кислорода. Такие фотосенсибилизированные реакции, протекающие, в частности, в ДНК, реализуются с участием молекул-сенсибилизаторов, которые либо передают энергию возбуждения на азотистые основания, обеспечивая тем самым их последующую димеризацию, либо в возбужденном состоянии реагируют с мононуклеотидами, образуя аддукты. К первой группе фотосенсибилизаторов относятся некоторые кетоны; вторую группу составляют производные фурукумаринов (псоралены). При фотосенсибилизации с помощью псораленов в ДНК образуются два типа фотопродуктов: (1) моноаддукты

(молекула псоралена ковалентно связана с одним пиримидином) и (2) диаддукты, или межнитевые ковалентные шивки (молекула псоралена ковалентно связана с двумя пиримидинами).

В последующих разделах рассматриваются первичные механизмы основных типов фотохимических реакций, которые индуцируются в биологически важных макромолекулах и мембранах светом различных длин волн и обуславливают повреждающее действие оптического излучения на клетки.

#### § 4. Фотохимические реакции в ДНК и ее компонентах

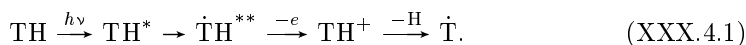
☐ Согласно общепринятому мнению, ДНК — основная внутриклеточная мишень при летальном и мутагенном действии коротковолнового УФ-излучения. Это, в частности, подтверждается совпадением максимума в спектрах действия фотобиологических эффектов (260–265 нм) с максимумом в спектре поглощения ДНК. ☐

Основными хромофорами ДНК являются азотистые основания нуклеотидов, причем квантовые выходы фотопревращений пиримидиновых компонентов примерно на порядок выше, чем пуриновых. Поглощение азотистыми основаниями квантов УФ-света (максимум поглощения при 260 нм) приводит к образованию их электронно-возбужденных синглетных и триплетных состояний, которые возникают преимущественно в результате  $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходов.

При относительно низких интенсивностях УФ-излучения обычных источников возбуждаются низколежащие синглетные ( $S_1$ ) и триплетные ( $T_1$ ) электронные уровни молекул за счет поглощения ими одного кванта. В  $S_1$ - и  $T_1$ -состояниях основания ДНК вступают в различные фотохимические реакции, из которых с наибольшим квантовым выходом идут три реакции фотоприсоединения: димеризация, гидратация и образование (6–4) пиримидиновых аддуктов.

Помимо одноквантовых реакций основания ДНК могут вступать в фотохимические реакции и при поглощении двух квантов УФ-света. Такие двухквантовые реакции удается наблюдать либо в «жестких» средах (замороженные до стеклообразного состояния органические растворители) при облучении уже низкоинтенсивным УФ-светом ртутных ламп, либо при импульсном высокоинтенсивном УФ-излучении лазерных источников. В последнем случае двухквантовое возбуждение оснований происходит и в жидких средах при комнатной температуре.

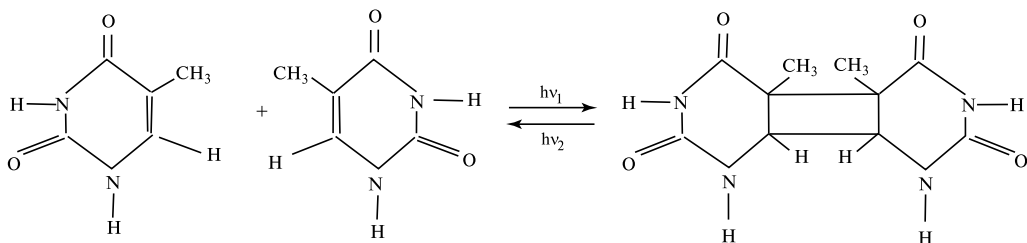
В «жесткой» среде вследствие ограниченности движения молекул время их жизни в 1-м возбужденном триплетном состоянии ( $T_1$ ) достигает теоретических величин ( $\sim 1 \div 10$  с), что обуславливает высокую концентрацию молекул в  $T_1$ -состоянии. Это, в свою очередь, увеличивает вероятность поглощения 2-го кванта света даже при низких интенсивностях УФ-излучения от обычных источников. В результате происходит заселение высшего триплетного уровня  $T_n$  ( $T_1 \rightarrow T_n =$  поглощение). В высоковозбужденном триплетном состоянии молекула приобретает способность вступать в такие фотохимические реакции, которые не наблюдаются в условиях одноквантовой фотохимии. Так, при облучении тимина (ТН) в кислых и щелочных стеклах при 225 К происходит его двухквантовая ионизация с образованием радикала  $\dot{T}$  по схеме



Гидратированные электроны и радикалы тимина обнаружены методом ЭПР. Особенность такой двухквантовой реакции связана с тем, что молекула после поглощения кванта в низшем возбужденном  $T_1$ -состоянии переходит в одно из высоковозбужденных состояний, энергия которых превышает энергию ионизации молекулы. Это и обуславливает необычные с точки зрения классической фотохимии химические превращения молекул.

В жидких средах при комнатной температуре двухквантовые процессы в основаниях ДНК реализуются при использовании УФ-излучения лазерных источников. При высоких интенсивностях лазерного УФ-излучения ( $> 10^8$  Вт/м) увеличивается как заселенность  $S_1$  и  $T_1$ -уровней оснований, так и скорость их опустошения в результате переходов вверх. Это приводит к двухквантовому возбуждению высоколежащих электронных уровней ( $S_n$  и  $T_n$ ) через промежуточные уровни  $S_1$  и  $T_1$  с последующей ионизацией молекул и эффективным протеканием химических реакций, не наблюдающихся (либо идущих с очень низким квантовым выходом) при одноквантовом возбуждении.

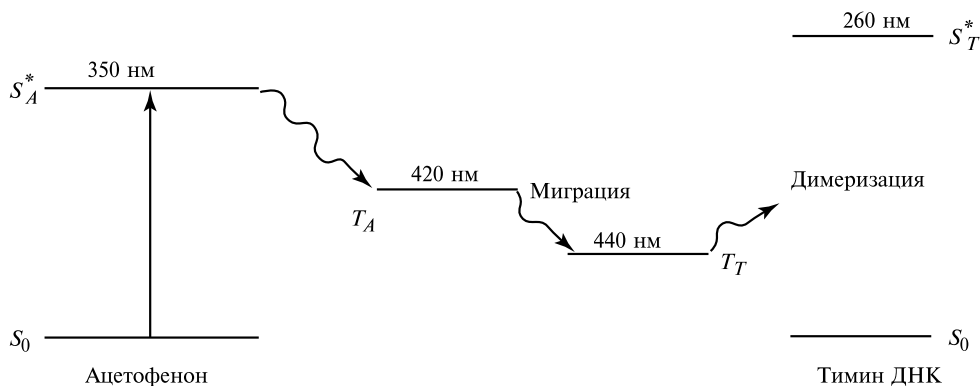
**Реакция фотодимеризации.** Эта реакция впервые была обнаружена при УФ-облучении замороженных растворов тимина. Она состоит в соединении двух оснований по 5,6-двойной углеродной связи с образованием кольца циклобутанового типа:



Считают, что димеры пиримидиновых оснований (прежде всего тимина), образующиеся в одной цепи ДНК, составляют 70–80% от всех летальных повреждений, индуцируемых коротковолновым УФ-светом. Характерная черта реакции димеризации — ее фотообратимость. Пиримидиновые основания поглощают свет в области 200–300 нм, их димеры — примерно в том же диапазоне УФ-спектра (200–285 нм). Поэтому при УФ-облучении оснований или ДНК для каждой длины волны возбуждающего света между димерами и основаниями устанавливается динамическое равновесие, определяемое соотношением поперечных сечений димеризации оснований и мономеризации димеров. Так, в случае облучения тимина при 280 нм димеризуется около 65% оснований, а при 280 нм — около 15%.

▽ Вследствие бимолекулярного характера реакции фотодимеризации ее квантовый выход существенно зависит от степени взаимориентации мономеров при возбуждении одного из них. Например, квантовый выход димеризации тимина в водном растворе при комнатной температуре  $\simeq 4,7 \cdot 10^{-4}$ , а в замороженном растворе  $\simeq 1$ . Квантовый выход димеризации тимина в ДНК  $\simeq 2 \cdot 10^{-2}$ . В соответствии с проведенными расчетами, условия для димеризации тимина в ДНК являются оптимальными, если соседние мономеры ориентированы друг к другу под углом в  $36^\circ$ . □

Вопрос о том, через какое электронно-возбужденное состояние пиримидиновых оснований (первое синглетное или триплетное) осуществляется димеризация, подробно исследовали на растворах тимина и ДНК с использованием тушителей триплетных состояний и метода фотосенсибилизации. Данные об уменьшении выхода циклобутановых димеров при облучении тимина в присутствии триплетных тушителей (кислород и парамагнитные ионы) свидетельствуют о том, что в этом случае димеры тимина возникают через триплетное состояние основания. Однако те же триплетные тушители не оказывают никакого влияния на эффективность образования тиминовых димеров в ДНК. Поэтому можно было бы считать, что в ДНК димеризация тимина идет через синглетное возбужденное состояние основания. Однако отсутствие влияния триплетных тушителей на выход димеров в ДНК может быть связано и с тем, что константа скорости димеризации на триплетном уровне за счет близкого и благоприятного расположения молекул тимина намного больше константы скорости тушения триплетного состояния. Если такое предположение верно, то димеризация тимина в ДНК возможна и через триплетное состояние. Образование тиминовых димеров в ДНК через триплетное состояние продемонстрировано в опытах по селективному заселению триплетного уровня с помощью фотосенсибилизатора ацетофенона, у которого синглетный возбужденный и триплетный уровни расположены по отношению к соответствующим уровням тимина в соответствии со схемой



На схеме значения энергий уровней даны в длинах волн квантов соответствующей энергии. При облучении раствора ДНК в ацетофеноне светом длиной волны 350 нм кванты поглощаются только сенсибилизатором. В дальнейшем происходит перенос энергии с триплетного уровня сенсибилизатора (ацетофенон характеризуется весьма высокой степенью интерконверсии) на триплетный (но не синглетный) уровень тимина, который взаимодействует с соседней молекулой тимина с образованием димера циклобутанового типа.

Результаты опытов с ацетофеноном подтверждают принципиальную возможность димеризации через триплетное состояние тимина. Однако они не дают ответа на вопрос о механизме образования димеров в том случае, когда имеет место прямое возбуждение тиминовых оснований в ДНК. Недавно этот вопрос исследован путем двухступенчатого возбуждения молекул тимина в полинуклеотиде с использованием пикосекундных и наносекундных импульсов высокоинтенсивного лазер-

ного УФ-излучения (266 нм). Установлено, что при переходе от низкоинтенсивного ( $\sim 1 \text{ Вт/м}^2$ ) к высокоинтенсивному ( $5 \cdot 10^{13} \text{ Вт/м}^2$ ) пикосекундному УФ-облучению квантовый выход образования димеров в полинуклеотиде падает в  $\sim 10$  раз. При наносекундном же лазерном УФ-облучении ( $\leq 10^{11} \text{ Вт/м}^2$ ) выход тиминных димеров оказался таким же, как и в случае низкоинтенсивного УФ-облучения. Уменьшение квантового выхода димеризации при пикосекундном УФ-облучении объясняется эффективным опустошением  $S_1$ -уровня за счет двухступенчатого возбуждения высоколежащих синглетных уровней. В то же время при наносекундном УФ-облучении, когда происходит опустошение  $T_1$ -уровня, уменьшения квантового выхода димеризации тимина не наблюдается. На основании этих данных делается вывод о том, что в полимерах нуклеиновых кислот пиримидиновые димеры образуются в основном через  $S_1$ -состояние оснований.

Существует мнение, что димер тимина образуется непосредственно из эксимера, минуя стадию лабильного химического фотопродукта. Как видно из структурной формулы димера, замыкание углеродных связей между двумя молекулами тимина происходит в 5-м и 6-м положениях, между которыми в соответствии с квантово-механическими расчетами в 1-м возбужденном состоянии наиболее высокая концентрация неспаренных электронов. Это и способствует «разрыву» 5,6-двойной связи и замыканию межтиминных связей.

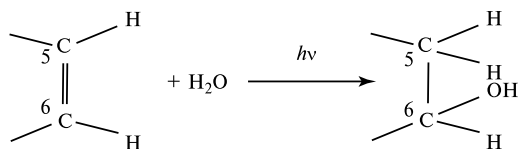
Некоторые красители акридинового ряда могут эффективно уменьшать выход УФ-индуцированных димеров в ДНК. Защитное свойство акридинов основано на их способности интеркалировать между парами оснований в молекуле ДНК. Характерная черта взаимодействия акридинов (например, акридиновый оранжевый) с ДНК заключается в том, что при образовании комплекса резко увеличивается интенсивность флуоресценции красителя в максимуме спектра при 530 нм. По мнению некоторых авторов, это может быть обусловлено синглет-синглетной миграцией энергии возбуждения с оснований ДНК на краситель. Расчеты показывают, что максимальный квантовый выход такой миграции энергии достигается при соотношении 1 молекула красителя/ $\sim 5$  оснований, и составляет 32%.

Помимо увеличения интенсивности флуоресценции тестом на связывание акридинов с ДНК может служить также изменение степени поляризации люминесценции, зависящей от подвижности молекул красителей. С помощью этого метода показано, в частности, что плоскость кольца акридинового оранжевого перпендикулярна длинной оси спирали ДНК и параллельна плоскостям оснований.

Обсуждают два возможных механизма защитного действия акридиновых красителей. Одни авторы считают, что уменьшение выхода пиримидиновых димеров в присутствии акридинов происходит в результате дезактивации ими возбужденных состояний оснований ДНК. При этом одна молекула красителя за счет синглет-синглетной или триплет-триплетной миграции может принимать энергию от 10–20 оснований. По мнению других авторов, предотвращение формирования димеров происходит за счет изменения структуры молекулы ДНК при интеркарировании красителя, что в силу бимолекулярного характера реакции фотодимеризации приводит к уменьшению ее квантового выхода.

**Реакция фотогидратации.** Этот процесс — вторая важная фотохимическая реакция пиримидиновых оснований ДНК, которая заключается в присоединении воды к пиримидиновому кольцу у  $C_5(\text{H})$  и  $C_6(\text{OH})$  углеродных атомов с разрывом двойной

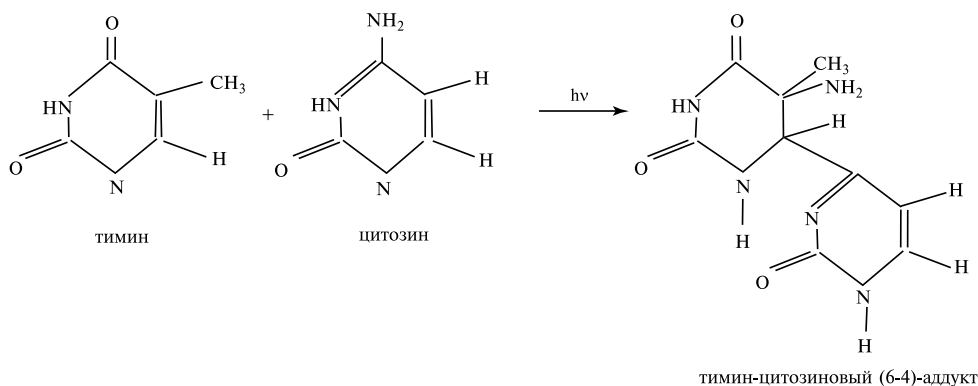
связи между ними и образованием 6-окси-5-гидропроизводных оснований:



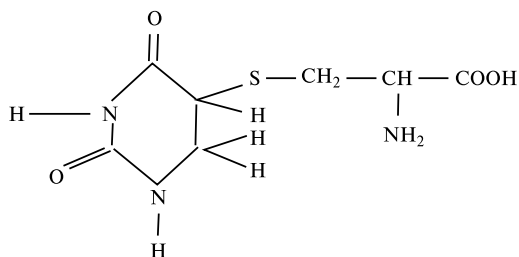
В отличие от димеризации реакция гидратации не является фотообратимой. Однако гидраты могут разрушаться при повышении температуры ( $> 30^\circ \text{C}$ ) и ионной силы раствора, а также при сдвигах pH. Скорость фотогидратации уменьшается при замене  $\text{H}_2\text{O}$  на  $\text{D}_2\text{O}$ . Предшественниками гидратов пиримидинов являются, видимо, их синглетные возбужденные состояния. В пользу этого свидетельствуют следующие данные: триплетные тушители не влияют на фотогидратацию; квантовый выход реакции не зависит от длины волны УФ-света, хотя вероятность конверсии в триплетное состояние зависит от нее; избирательное фотосенсибилизированное заселение триплетных уровней оснований (например, с помощью ацетофенона) не приводит к их гидратации.

Особенность реакции фотогидратации заключается в том, что она протекает только в одноцепочечной ДНК. 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 одноцепочные участки ДНК.  $\square$

**Образование (6-4) пиримидиновых аддуктов.** Эти фотопродукты, характеризующиеся абсорбцией при 315-320 нм и флуоресценцией в области 405-440 нм, были выделены из кислотного гидролизата УФ-облученной ДНК. Структура аддуктов была установлена с помощью УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Квантовый выход (6-4)-аддуктов порядка  $10^{-3}$ , т. е. в  $\sim 10$  раз меньше, чем циклобутановых димеров, и следовательно, в летальный эффект УФ-излучения (254 нм) 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. Полагают, что реакция образования (6-4) пиримидиновых аддуктов идет по схеме:



**Сшивки с белками.** Это пример межмолекулярных взаимодействий, относящихся к третьему типу фотохимических реакций, в которые вступают пиримидиновые основания ДНК. Акцепторами УФ-света являются оба компонента, поскольку облучение как белка, так и ДНК перед смешиванием сопровождается образованием сшивок. Механизм данного процесса, вероятно, заключается в прикреплении аминокислотных остатков белка через SH- или OH-группы к C<sub>5</sub> или C<sub>6</sub> цитозина или тимина ДНК. В модельной системе наблюдали образование по такому механизму 5-S-цистеин-6-гидроурацила:



Рассмотренные выше фотохимические реакции ДНК протекают с участием низших возбужденных (синглетное и триплетное) состояний пиримидиновых оснований, которые возникают в результате поглощения одного кванта УФ-света. Вместе с тем при определенных условиях, которые будут описаны ниже, основания ДНК могут вступать в фотохимические реакции и при поглощении двух квантов УФ-света.

### § 5. Особенности действия высокоинтенсивного лазерного УФ-излучения на ДНК (двухквантовые реакции)

До создания лазерных источников УФ-излучения классическая УФ-фотобиология рассматривала в основном процессы, линейные по интенсивности УФ-света, т. е. изучались биологические эффекты одноквантовых фотохимических реакций. В отличие от света, испускаемого обычными некогерентными источниками, лазерное излучение обладает такими замечательными 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, особенностей протекающих при этом фотохимических реакций и их проявления на биологическом уровне.

Двухквантовое возбуждение азотистых оснований ДНК в водном растворе при комнатной температуре осуществляется с помощью наносекундных ( $\tau = 10$  нс) и пикосекундных ( $\tau = 30$  пс) импульсов лазерного УФ-излучения с длиной волны 266 нм, близкой к максимуму первой электронной полосы поглощения  $S_0 \rightarrow S_1$  оснований. Это достигается при интенсивностях излучения выше  $10^8$  Вт/м<sup>2</sup>, когда возрастает заселенность уровней  $S_1$  и  $T_1$  и скорость их опустошения в результате переходов вверх, вследствие чего реализуется возбуждение высоколежащих электронных уровней ( $S_n$  и  $T_n$ ) оснований через промежуточную ступень — уровни  $S_1$  и  $T_1$ . Такое



двухквантовое возбуждение через реальное промежуточное состояние называется двухступенчатым.

Экспериментальные исследования, в которых водные растворы азотистых оснований облучали пикосекундными или наносекундными импульсами УФ-излучения (266 нм), показали, что при интенсивностях выше  $10^{10}$  Вт/м<sup>2</sup> происходят необратимые фотохимические изменения молекул, причем образующиеся продукты качественно отличаются от фотопродуктов одноквантовых реакций, таких, как пиримидиновые димеры и гидраты.

Степень деградации оснований квадратично зависит от интенсивности излучения, что свидетельствует о двухквантовом механизме лазер-индуцированных фотохимических превращений.

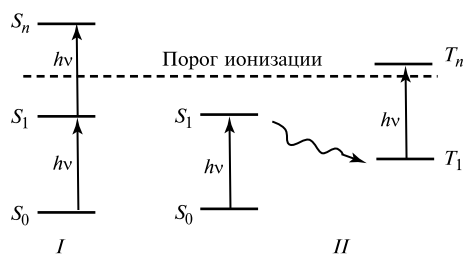
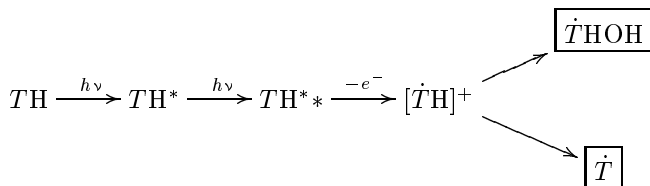


Рис. XXX.3.

Синглетный (I) и триплетный (II) каналы двухступенчатого возбуждения:

$S_0$  — невозбужденный синглетный уровень,  $S_1$  — первый синглетный возбужденный уровень,  $S_n$  — высоколежащий возбужденный синглетный уровень,  $T_1$  — первый возбужденный триплетный уровень,  $T_n$  — высоколежащий возбужденный триплетный уровень

Теоретический анализ процессов, происходящих при ступенчатом поглощении молекулой двух квантов света, показал, что при пикосекундных импульсах заселение высоколежащих электронных состояний происходит по синглетному каналу ( $S_0 \xrightarrow{h\nu} S_1 \xrightarrow{h\nu} S_n$ ), тогда как при наносекундных импульсах — по триплетному ( $S_0 \xrightarrow{h\nu} S_1 \rightarrow T_1 \xrightarrow{h\nu} T_n$ ) (рис. XXX.3). Однако независимо от того, по какому каналу ( $S-S$  или  $T-T$ ) поглощается 2-й квант излучения, в реакциях участвуют, вероятно, фотоионизированные состояния молекул. В пользу такой точки зрения могут свидетельствовать экспериментальные данные о сходстве конечных продуктов лазерного фотолиза и продуктов гамма-радиолиза оснований ДНК, при котором процессы идут, как известно, через стадию ионизации молекул. На основе этих данных предложена схема первичных стадий превращений молекулы тимина при лазерном фотолизе:



Возможность фотоионизации оснований при лазерном УФ-облучении можно показать также, оценивая значение энергии, которую приобретает молекула в результате поглощения двух квантов излучения. При поглощении тиминном, находящимся в нижнем триплетном состоянии ( $E = 3,2$  эВ), кванта с длиной волны 266 нм

(4,88 эВ) суммарная энергия молекулы ( $\sim 8$  эВ) не достигает значения адиабатного потенциала ионизации тимина в газовой фазе ( $\sim 8,9$  эВ). В конденсированной среде потенциал ионизации уменьшается за счет взаимодействия образующихся ионов со средой:

$$I = I_r - P_+ - V_0,$$

где  $I_r$  — потенциал ионизации в газовой фазе,  $P_+$  — энергия поляризации среды катионом,  $V_0$  — энергия взаимодействия «избыточного» электрона со средой (для воды  $V_0 = +1,3$ ). Так как  $P_+ > 0$ , то потенциал ионизации тимина в водном растворе будет ниже 7,65 эВ. Иными словами, поглощение 2-го кванта действительно может привести к ионизации молекулы.

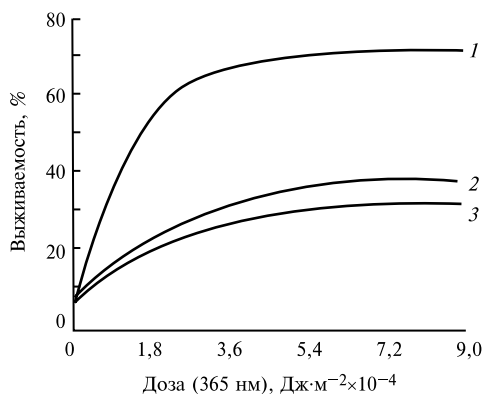


Рис. XXX.4.

Зависимость фотореактивности дрожжей, облученных лазерным УФ (266 нм) различной интенсивности, от дозы фотореактивирующего света (365 нм):

1 —  $10^7$  Вт·м<sup>-2</sup>, 2 —  $10^9$  Вт·м<sup>-2</sup>, 3 —  $5 \cdot 10^9$  Вт·м<sup>-2</sup>

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. Показано, что квантовый выход однонитевых разрывов при переходе от низкоинтенсивного УФ-облучения ( $1$  Вт/м<sup>2</sup>) к высокоинтенсивному пикосекундному УФ-облучению ( $4 \cdot 10^{13}$  Вт/м<sup>2</sup>) возрастает от  $(1 \div 2) \cdot 10^{-6}$  до  $8 \cdot 10^{-5}$ . □

Вклад двухквантовых фотоповреждений ДНК по сравнению с одноквантовыми (пиримидиновые димеры) в лазерную УФ-инактивацию плазмид, бактериофагов и микроорганизмов значительно выше. Об этом, в частности, свидетельствуют эксперименты по изучению фотореактивации УФ-облученных биологических объектов. Они показали, что с ростом интенсивности лазерного УФ-излучения (266 нм) степень фотореактивации резко уменьшается (рис. XXX.4). Поскольку при фотореактивации ликвидируются летальные фотопродукты только одного типа — циклобутановые пиримидиновые димеры ДНК, то установленный факт свидетельствует об уменьшении вклада димеров (и соответственно увеличении вклада двухквантовых фотоповреждений ДНК) в лазерную УФ-инактивацию.

## § 6. Фотореактивация и фотозащита

**Фотореактивация.** Это фотобиологический процесс, направленный на устранение УФ-индуцированных летальных фотопродуктов ДНК. Механизм этого процесса предполагает участие специального фоточувствительного фермента фотолиазы, субстратом которого являются только пиримидиновые димеры. Фотореактивация приводит к распаду димеров пиримидина. Кинетические закономерности реакции фотоферментативного расщепления димеров соответствуют кинетике классических ферментативных процессов, описываемых по схеме Михаэлиса—Ментен:



В случае реакции фотомономеризации димеров каталитический акт в фермент-субстратном комплексе протекает только под действием света (320–500 нм): фотолиаза работает в электронно-возбужденном состоянии. При этом, видимо, происходит перенос электрона от фермента к субстрату — димеру. Такую точку зрения подтверждают данные об ингибировании процесса ферментативного фоторасщепления димеров активными акцепторами электронов ( $\text{KNO}_3$  и  $\text{KCl}$ ), а также результаты модельных экспериментов по фотосенсибилизированному расщеплению димеров в ДНК некоторыми индольными производными, которое, как показано, включает стадию переноса электрона от сенсибилизатора к димеру. □

К настоящему времени фермент, ответственный за фотореактивацию, выделен из многих биологических объектов, однако его хромофорную группировку удалось идентифицировать пока только у двух фотолаз: бактериальной и дрожжевой. Анализ спектральных свойств этих ферментов позволил отнести их хромофорные группы к соединениям флавиновой природы: у дрожжевой фотолиазы это восстановленный ФАД (ФАД<sub>вос</sub>) с максимумом поглощения при 380 нм; а у бактериальной — производное диазофлавина с максимумом поглощения, зависящим от pH в области от 375 до 420 нм. Представляют интерес данные о том, что флавиновый хромофор в модельной системе обладает способностью к фоторасщеплению пиримидиновых димеров в ДНК, что может свидетельствовать о его роли как кофактора фотолиазы.

Недавно показано, что, образуя комплекс с димером, фотолиаза связывается с участком цепи ДНК в ~ 4 пары оснований. При поглощении кванта света фотовозбужденный флавиновый хромофор фотолиазы донирует электрон димеру с образованием аниона пиримидинового димера. Эта форма нестабильна и спонтанно распадается на два свободных пиримидина плюс электрон. Восстановление флавинового хромофора может затем происходить путем захвата электрона от распавшегося аниона димера.

**Фотозащита.** Помимо фотоферментативного расщепления димеров ДНК (процесс фотореактивации), уменьшить выход этих фотопродуктов в клетках можно с помощью другого фотобиологического процесса — фотозащиты. Фотозащитный эффект заключается в том, что предварительное облучение меток длинноволновым УФ-светом приводит к значительному уменьшению их чувствительности к летальному действию коротковолнового УФ-излучения. Недавно такой эффект обнаружен у ряда представителей дрожжевых организмов. □

Характерная особенность фотозащитного эффекта заключается в том, что для его проявления необходим температурно-зависимый интервал времени между последовательными воздействиями на клетки длинноволнового и коротковолнового УФ-света. В этот интервал времени в клетках происходит фотоиндуцированное образование определенного соединения, идентифицированного как 5-окситриптамиин, или серотонин. Роль данного соединения в качестве основного интермедиата в процессе фотозащиты подтверждается следующими результатами. 1. Фотозащита практически не наблюдается у клеток, дефицитных по предшественникам синтеза серотонина (триптофан и 5-окситриптофан), однако эффект вновь проявляется при их экзогенном введении в клетки. 2. Специфический ингибитор цепи синтеза серотонина полностью снимает эффект фотозащиты. 3. Экзогенно добавленный к клеткам серотонин вызывает эффект защиты от УФ-инактивации, аналогичный фотозащите, т. е. серотонин обладает фотомиметическим действием.

Согласно данным, полученным в опытах *in vivo* и в модельных экспериментах (Г. Я. Фрайкин), защитное действие серотонина в процессе фотозащиты осуществляется в результате его связывания с ДНК и уменьшения выхода в ней УФ-индуцированных пиримидиновых димеров. Спектрофлуориметрический анализ показал, что серотонин связывается с ДНК интеркаляционным путем. При этом каждая интеркалированная молекула серотонина может уменьшать выход димеров в ДНК на участке цепи, включающем  $\sim 4$  пары оснований.

### § 7. Действие длинноволнового ультрафиолетового света на ДНК (фотодинамические реакции)

До сих пор рассматривались только те фотохимические реакции ДНК, которые индуцируются коротковолновым УФ-светом. Вместе с тем проведенные в последние годы исследования позволили установить, что фотодеструктивные реакции в ДНК как *in vivo*, так и *in vitro* могут протекать при действии длинноволнового УФ-света (320–400 нм). Однако для того чтобы наблюдать такие реакции, необходимо использовать весьма высокие интенсивности и дозы излучения, на 2–3 порядка (по интенсивности) и 5–6 порядков (по дозе) превышающие значения соответствующих параметров коротковолнового УФ-излучения.

∑ Длинноволновый УФ-свет индуцирует в ДНК образование двух основных фотопродуктов: пиримидиновых димеров и одноцепочечных разрывов. Выход димеров не зависит от того, в каких условиях производят облучение ДНК — аэробных или анаэробных, т. е. процесс образования димеров не является кислородзависимым. В то же время разрывы наблюдаются только при облучении ДНК в присутствии  $O_2$ . Эти данные свидетельствуют о различных механизмах образования двух типов фотопродуктов. С другой стороны, очевидно, что в обоих случаях молекула ДНК не может служить первичным хромофором при действии УФ-излучения длин волн больше 320 нм, поскольку длинноволновая граница ее поглощения лежит при 300–310 нм. Следовательно, и димеры, и разрывы должны образовываться не за счет прямого поглощения квантов молекулой ДНК, а косвенным путем с участием определенных молекул — хромофоров, тесно связанных с ДНК. □

Очевидно, что как сами хромофоры, так и механизмы сенсibilизируемых ими фотохимических реакций, приводящих к образованию димеров и разрывов, должны

быть различными. Зависимость от  $O_2$  выхода разрывов позволяет считать, что образование этих фотопродуктов идет по фотодинамическому механизму. Такой механизм, как известно, осуществляется при наличии следующей комбинации факторов: свет + хромофор +  $O_2$ .

Молекула возбужденного хромофора (сенсibilизатора) на первичной стадии может либо непосредственно взаимодействовать с субстратом, либо, альтернативно, с кислородом в реакционной смеси, приводя к образованию активных интермедиатов, которые в свою очередь способны реагировать с субстратом. Таким образом, как и любая фотохимическая реакция, фотосенсibilизированный процесс имеет начальную «световую стадию», за которой следуют «темновые стадии». Большинство фотосенсibilизированных реакций протекает по весьма сложному механизму, включающему несколько конкурентных процессов. Наиболее характерные типы первичных реакций, в которые вступают возбужденные (главным образом триплетные) сенсibilизаторы с молекулами биосубстрата, заключаются либо в переносе электрона (или атома водорода) (реакции типа I), либо в переносе энергии (или электрона) на кислород (реакции типа II).

Известно, что молекула в триплетном состоянии способна легче как отнимать электроны (атомы водорода) от других молекул, так и донировать эти частицы молекулам субстрата. Эффективность таких реакций зависит от химической структуры сенсibilизатора и субстрата, а также от условий протекания реакции. Так, фотосенсibilизированные реакции типа I с наибольшей эффективностью протекают при высокой концентрации субстрата и низкой концентрации кислорода, поскольку кислород является сильным конкурентом молекулы субстрата за взаимодействие с триплетным сенсibilизатором. Можно ожидать, что образование нековалентных комплексов между сенсibilизатором и субстратом до облучения увеличит вероятность реакций типа I из-за близости сенсibilизатора к молекулам субстрата. Во-вторых, наиболее эффективно фотодеградируют по механизму типа I те субстраты, которые легко окисляются или восстанавливаются.

Главный механизм фотосенсibilизированных реакций типа II заключается в переносе энергии от триплетного сенсibilизатора на основное состояние кислорода с образованием электронно-возбужденного синглетного состояния кислорода ( $^1O_2$ ) и основного состояния сенсibilизатора:

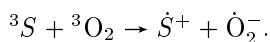


Синглетный кислород может существовать в двух возбужденных состояниях: одно —  $^1\Sigma_g^+$  — с более высокой энергией ( $\sim 1,6$  эВ), другое —  $^1\Delta_g$  — с более низкой энергией ( $\sim 1$  эВ). Время жизни  $^1\Sigma_g^+$ -состояния в растворе составляет 0,01–0,1 нс, тогда как  $^1\Delta_g$ -состояние обладает намного более длительным временем жизни (от 2–4 мкс в воде до нескольких десятков мкс в липидах). Поэтому  $^1\Delta_g$ -состояние является основной формой синглетного кислорода, участвующей в фотодинамических реакциях.

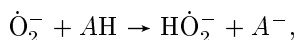
Наличие переноса энергии от триплетных сенсibilизаторов на кислород с переводом его в  $^1\Delta_g$ -состояние показано прямым методом измерения флуоресценции с максимумом при 1272 нм. Эффективный перенос энергии от  $^3S$  на  $^3O_2$  возможен лишь в том случае, если энергия  $^3S$ -состояния больше энергии синглетного уровня кислорода. Поскольку для молекулы кислорода величина энергии перехода в

$^1\Delta_g$ -состояние весьма мала, практически любая органическая молекула, находящаяся в триплетном состоянии, способна сенсibilизировать образование синглетного кислорода.

Выше отмечалось, что к механизму фотосенсibilизации типа II можно отнести и реакции, в которых происходит перенос электрона от молекулы триплетного сенсibilизатора на кислород:

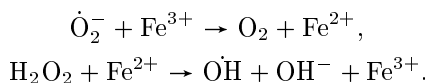


Образующийся супероксидный радикал ( $\dot{O}_2^-$ ) является относительно долгоживущей формой кислорода ( $\sim 2$  мс при физиологических рН), и в принципе способен вызывать депротонирование некоторых молекул:

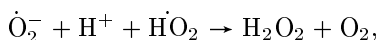


где  $H\dot{O}_2^-$  — гидропероксид.

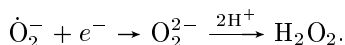
Однако, поскольку он характеризуется относительно низкой реакционной способностью, его повреждающее действие на биоструктуры реализуется главным образом за счет образования других реакционноспособных частиц ( $H\dot{O}_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH\dot{H}$ ), и в первую очередь гидроксильного радикала  $OH\dot{H}$ , который может образовываться из  $\dot{O}_2^-$  в катализируемых ионами железа реакциях Хабера–Вайса:



где  $H_2O_2$  (перекись водорода) является продуктом либо дисмутации  $O_2$ :



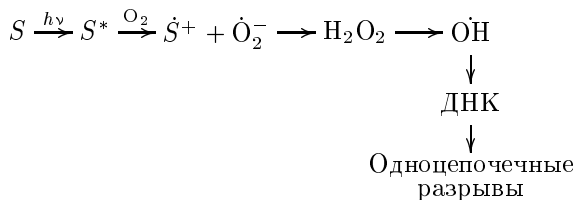
либо его одноэлектронного восстановления:



Наиболее реакционноспособный радикал  $OH\dot{H}$  легко (с константами скорости, близкими к диффузионно-контролируемым) взаимодействует с большинством биомолекул, отрывая или присоединяя атом водорода. В воде время жизни  $OH\dot{H} < 1\mu$  с, вследствие чего он, как и синглетный кислород, реагирует с молекулами биосубстрата в ближайшем микроокружении.

При фотосенсibilизированном образовании кислородо-зависимых одноцепочечных разрывов в ДНК в качестве эндогенных сенсibilизаторов могут выступать такие распространенные биохимические компоненты, как НАД·Н, 4-тиоуридин и 2-тиоурацил, которые имеют максимумы поглощения в длинноволновой УФ-области спектра (при  $\sim 340$  нм). Установлено, что фотосенсibilизированная этими соединениями инициация разрывов в ДНК осуществляется по фотодинамическому механизму с участием активированных форм кислорода. При этом первичной фотогенерируемой формой кислорода является супероксидный анион-радикал ( $\dot{O}_2^-$ ). Однако  $\dot{O}_2^-$  обладает сравнительно малой реакционной способностью. Поэтому в качестве непосредственного инициатора разрывов в ДНК выступает его значительно более реакционноспособный продукт — радикал  $OH\dot{H}$ . В соответствии с полученными

данными, фотосенсибилизированные реакции образования кислородных радикалов, приводящие к одноцепочечным разрывам в ДНК, можно представить в виде следующей схемы:



Отсутствие зависимости от  $O_2$  выхода пиримидиновых димеров при облучении ДНК длинноволновым УФ-светом свидетельствует о том, что их образование осуществляется не по фотодинамическому механизму, а путем молекулярной фотосенсибилизации, при которой энергия возбуждения с молекулы хромофора, поглотившей квант света, переносится на пиримидиновое основание ДНК. (Выше был рассмотрен пример образования димеров по такому механизму, когда в качестве первичного хромофора-сенсибилизатора выступала молекула ацетофенона).

Индукцируемые длинноволновым УФ-светом повреждения ДНК обуславливают инактивирующий, летальный и мутагенный эффекты при действии этого излучения на трансформирующую ДНК, бактериофаги и микроорганизмы. Сильная зависимость фотобиологических эффектов от  $O_2$ , а также отсутствие фотореактивации позволяют считать, что основными летальными фотопродуктами являются одноцепочечные разрывы ДНК, а не пиримидиновые димеры, как это имеет место в случае действия коротковолнового УФ-излучения. Роль разрывов в инактивирующих эффектах длинноволнового УФ-света подтверждается данными о совпадении спектров действия фотоинактивации биологических объектов со спектром действия образования разрывов в ДНК.  $\square$

Рассмотренный выше материал свидетельствует о том, что фотодеструктивные реакции в ДНК индуцируются не только коротковолновым, но и длинноволновым УФ-излучением. Поскольку большинство биологических систем подвергается действию солнечного света, необходимо детально исследовать молекулярные механизмы биологических эффектов длинноволнового УФ. Это тем более важно, что длинноволновое УФ-излучение является эффективным в индукции эритемы и рака кожи человека и животных, особенно при его комбинированном действии со средневолновым УФ (290–320 нм), приводящем к синергическим эффектам.

Такого рода синергические фотодеструктивные реакции обнаружены также при комбинированном действии различных длин волн УФ-спектра на ДНК, бактериофаги, микроорганизмы и некоторые другие биологические системы. Однако механизмы, лежащие в основе этих реакций, в настоящее время исследованы мало.

## § 8. Действие ультрафиолетового света на белки

Второй внутриклеточной мишенью при действии УФ-излучения на биологические системы являются белки. УФ-свет инактивирует белки по одноквантовому, одноударному механизму с квантовым выходом для разных белков от  $10^{-2}$  до  $10^3$ . Чтобы идентифицировать природу белковых хромофоров, взаимодействие

света с которыми приводит к инактивации белков, нужно наряду со спектром действия процесса измерять степень фотоповреждения различных аминокислот при разных длинах волн и дозах УФ-излучения. Использование такого подхода позволяет выявить роль определенных аминокислотных остатков в поддержании нативной структуры белков или ферментов. □

Если принять, что из  $n_i$  остатков какой-то аминокислоты в белковой молекуле  $m_i$  остатков существенны для сохранения ее интактности и «поперечное сечение» разрушения этих остатков ( $\sigma_i$ ) — величина постоянная, то сумма поперечных сечений фотолиза всех остатков данной аминокислоты будет равна

$$\sigma_1 m_1 + \sigma_2 m_2 + \dots + \sigma_n m_n = \sum_i \sigma_i m_i. \quad (\text{XXX.8.1})$$

Так как при УФ-облучении белков фотолизу подвергаются главным образом триптофан и цистин, то выражение для поперечного сечения инактивации белка ( $\sigma_b$ ) можно записать в следующем виде:

$$\sigma_b = \sigma_{\text{три}} m_{\text{три}} + \sigma_{\text{цис}} m_{\text{цис}}. \quad (\text{XXX.8.2})$$

Величину  $\sigma_b$  можно определить из дозовой кривой инактивации белка, а значения  $\sigma_{\text{три}}$  и  $\sigma_{\text{цис}}$  — из дозовых кривых фотолиза триптофанового и цистинового остатков в данном белке. Однако остается невыясненным, какие именно остатки триптофана и цистина являются «существенными» для инактивации белка. Решение этого вопроса возможно при использовании монохроматического облучения белка УФ-светом различных длин волн, которые по-разному поглощаются триптофаном и цистином (например, 254 нм и 280 нм). В данном случае значения  $\sigma_b$  определяют для обеих длин волн УФ-света:

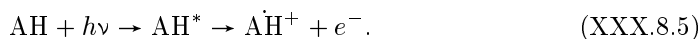
$$\sigma_b^{254} = \sigma_{\text{три}}^{254} m_{\text{три}} + \sigma_{\text{цис}}^{254} m_{\text{цис}}; \quad (\text{XXX.8.3})$$

$$\sigma_b^{280} = \sigma_{\text{три}}^{280} m_{\text{три}} + \sigma_{\text{цис}}^{280} m_{\text{цис}}. \quad (\text{XXX.8.4})$$

Из этих уравнений можно найти значения двух искомым величин:  $m_{\text{три}}$  и  $m_{\text{цис}}$ . С помощью этого подхода показано, например, что в тринсине разрушение одного остатка триптофана (из четырех) и одного остатка цистина (из шести) приводит к фотоинактивации фермента. В пепсине существенным для фотоинактивации оказалось разрушение только одного остатка триптофана.

Итак, именно фотолиз триптофана и цистина имеет первостепенное значение в фотоинактивации белков. Учитывая это, рассмотрим механизмы первичных УФ-индуцированных процессов в этих аминокислотах. □

В настоящее время доказано, что основной первичной фотореакцией триптофана (АН) в белке является его фотоионизация с образованием катион-радикала и сольватированного электрона:

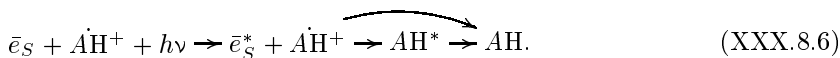


При комнатной температуре эта реакция протекает за 5–20 мкс и может быть исследована только с использованием метода флеш-фотолиза. Показано, что через

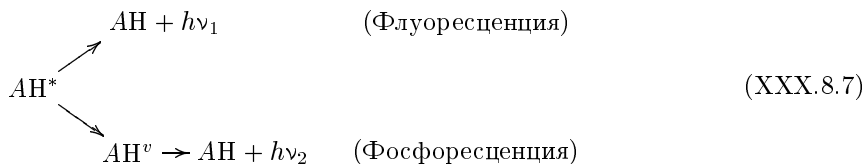


5 мкс после УФ-облучения в растворе триптофана появляются характерные максимумы поглощения в красной и дальней красной области спектра, которые принадлежат сольватированному электрону, т. е. электрону, «выбитому» из молекулы аминокислоты и захваченному дипольными молекулами растворителя. Сольватированный электрон быстро реагирует с другими молекулами, в частности, с молекулами растворителя и  $O_2$ , вследствие чего полоса его поглощения исчезает. Однако если облучать замороженные образцы триптофана при температуре жидкого азота (в этих условиях сольватированные электроны не рекомбинируют), то поглощение сольватированного электрона (максимум при 600 нм) можно зарегистрировать и на обычном спектрофотометре. Кроме того, наличие некомпенсированного магнитного момента (спин) у сольватированного электрона позволяет обнаружить его методом ЭПР.

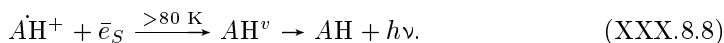
При облучении реакционной смеси из сольватированного электрона и катион-радикала триптофана красным светом, поглощаемым сольватированным электроном, происходит обратная фотохимическая реакция с образованием исходной аминокислоты:



При этом часть молекул аминокислоты оказывается в возбужденном состоянии, о чем свидетельствуют ее УФ-флуоресценция и синяя фосфоресценция (процесс фотоиндуцированной люминесценции):

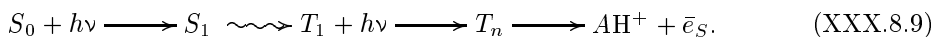


Рекомбинация сольватированного электрона и катион-радикала триптофана происходит и спонтанно за счет термической активации выхода электрона из ловушки. В результате наблюдается рекомбинационное свечение, активируемое при нагревании (термолюминесценция):



Исследование рассмотренных выше процессов позволило получить данные о механизме образования катион-радикала триптофана  $\dot{A}H^+$ . Линейная зависимость от интенсивности УФ-света интенсивности термолюминесценции и фотоиндуцированной люминесценции триптофана в замороженных водных растворах свидетельствовала о том, что его фотоионизация в этих условиях осуществляется по одно-квантовому механизму, причем предшественником катион-радикала является, вероятно, синглетное возбужденное состояние триптофана. Последнее подтверждается опытом, в котором показано, что увеличение темнового интервала между УФ-облучением замороженного водного раствора триптофана и действием красного света в пределах времени жизни триплетных состояний триптофана (6 мкс) не приводит

к возрастанию интенсивности фотоиндуцированной люминесценции, отражающей концентрацию  $\dot{A}N^+$ . Однако в сильнощелочных замороженных растворах триптофана интенсивность термолюминесценции и поглощение сольватированного электрона при 600 нм квадратично зависит от интенсивности УФ-света, что указывает на возможность фотоионизации молекулы по двухквантовому механизму. В этом случае поглощение 2-го кванта происходит, видимо, на триплетном уровне:



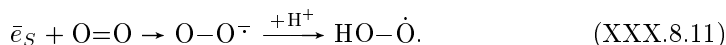
Кроме того, в водно-солевых (NaCl) замороженных растворах триптофана скорость образования  $\dot{A}N^+$  нелинейно зависела от интенсивности УФ-света со степенным показателем в пределах от 1 до 2, что указывает как на одноквантовые, так и двухквантовые реакции. Следовательно, при ионизирующем действии УФ-света на замороженные растворы триптофана электрон может отрываться как от синглетно-, так и от триплетно-возбужденной молекулы.

Что касается фотоионизации триптофановых остатков в белке при физиологических условиях, то она осуществляется, вероятно, только по одноквантовому механизму с участием синглетных возбужденных состояний молекул. В пользу этого свидетельствуют, в частности, экспоненциальные зависимости от дозы УФ-света как фотолиза триптофановых остатков, так и фотоинактивации белков. Предполагают, что возникающий в белках под действием УФ-света катион-радикал триптофана диссоциирует на протон и нейтральный радикал, который, взаимодействуя с соседними группами полипептидной цепи, образует межмолекулярную ковалентную «сшивку» — стабильный фотопродукт:



Если фотолизу подвергается триптофан, входящий в состав активного центра фермента, то этого, очевидно, достаточно, чтобы вызвать потерю его ферментативной активности. В том случае, когда происходит фотиразрушение триптофана вне активного центра, такая сшивка может изменить водородные, гидрофобные и другие слабые связи, поддерживающие нативную конформацию белковой макромолекулы, что также приведет к потере ее ферментативной активности.

Рассмотренный механизм прямого фотолиза триптофана — не единственная причина повреждающего действия УФ-излучения на белки. Второй механизм фотоинактивации белков связан с фотосенсибилизированными реакциями при участии сольватированного электрона. Последний, будучи сильным восстановителем, активно реагирует с различными соединениями, обладающими высоким сродством к электрону, и прежде всего — с растворенным  $O_2$ , образуя  $\dot{O}_2$  и гидроперекисный радикал  $\dot{H}O_2$ :



Однако реакции с участием молекулярного кислорода вносят незначительный вклад в процесс УФ-инактивации белков. Так, фотоинактивация трипсина проходит примерно с одинаковым квантовым выходом в присутствии кислорода (0,026) и в вакуумированных растворах (0,028). Наибольшее значение имеет взаимодействие сольватированного электрона непосредственно с аминокислотными остатками белковой

макромолекулы. При этом вероятность такого взаимодействия в зависимости от средства той или иной аминокислоты к сольватированному электрону может быть различной. Поскольку наибольшим средством к сольватированному электрону обладает цистин, можно ожидать, что именно эта аминокислота будет в первую очередь разрушаться в результате взаимодействия с сольватированным электроном.

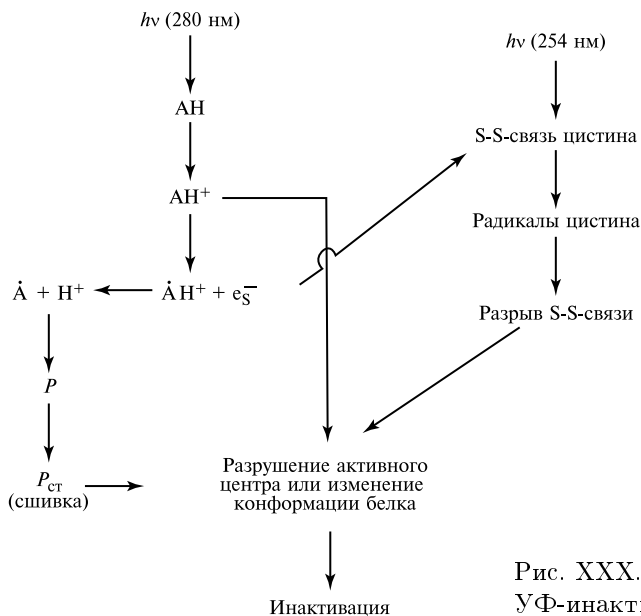
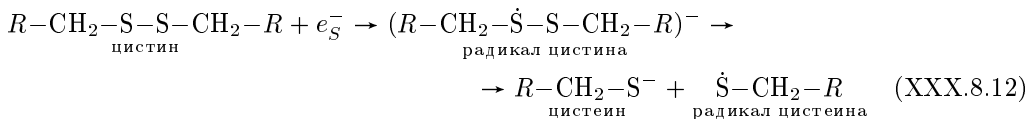


Рис. XXX.5.  
УФ-инактивация белков: АН-триптофан

Использование методов флеш-фотолиза и ЭПР позволило изучить механизм взаимодействия сольватированного электрона с цистином, который включает образование свободных радикалов по схеме



Дисульфидные группы белка могут разрушаться не только за счет фотосенсибилизированных реакций, но и вследствие прямого фотолиза. Наиболее эффективной в этом процессе является спектральная область, где максимально поглощает свет цистин, т. е. короче 260 нм. УФ-свет этих длин волн (например, 254 нм) особенно активен в инактивации белков, поскольку квантовый выход фотолиза цистина на порядок превышает таковой для триптофана. В соответствии с приведенными выше данными процесс фотоинактивации белков можно представить в виде общей схемы (рис. XXX.5).

### § 9. Действие оптического излучения на биологические мембраны

Согласно полученным в последнее время данным, мембранные структуры клеток служат важной критической мишенью при действии оптического излучения — как УФ-, так и видимого диапазонов. Мембраны выполняют в клетке в первую очередь барьерную функцию, основанную на их низкой проницаемости для полярных молекул и ионов. Оптическое излучение при определенных дозах вызывает увеличение проницаемости мембран для различных веществ, и прежде всего для ионов. Фотоиндуцированное изменение ионной проницаемости клеточных мембран обнаружено у самых разнообразных биологических объектов — от микроорганизмов до клеток растительных и животных организмов.

**Действие УФ-излучения.** Вызываемые УФ-излучением процессы изменения ионной проницаемости мембран наиболее подробно исследованы на животных клетках. Полученные результаты свидетельствуют о связи нарушения барьерной функции мембран главным образом с фотолизом липидов. Так, на эритроцитарных мембранах показано, что при дозе УФ-облучения (254 нм, 20 кДж/м<sup>2</sup>) ~ 90% каналов K<sup>+</sup>- и Na<sup>+</sup>-проницаемости в них возникает за счет фотолиза липидов; остальная часть таких каналов может быть отнесена к прямой фотомодификации мембранных белков.

Основной путь фотолиза мембранных липидов заключается в перекисном фотоокислении цепей полиненасыщенных жирных кислот фосфолипидов. Результатом такого фотоокисления является образование гидроперекисей и продуктов их дальнейшего превращения. При этом протекают две фотохимические реакции: кислородзависимая цепная реакция перекисного окисления, заканчивающаяся образованием гидроперекисной, и реакция разложения гидроперекисей, при которой накапливаются самые разнообразные продукты, в частности альдегиды и кетоны. Гидроперекиси поглощают при 233 нм и после добавления к ним солей Fe<sup>2+</sup> дают вспышку хемилюминесценции; продукты 2-й реакции обладают поглощением в области 260–280 нм и характеризуются способностью давать окраску с 2-тиобарбитуровой кислотой — реагентом на диальдегидную группу —CO—CO— (ТБК-активные продукты).

Процесс перекисного окисления липидов является фотосенсибилизированным, так как ненасыщенные жирные кислоты, не обладая способностью поглощать свет в средневолновой и длинноволновой области УФ-спектра, подвергаются перекисному фотоокислению при облучении в данной области спектра. Наиболее вероятными фотосенсибилизаторами могут быть продукты собственного окисления липидов (прежде всего гидроперекиси), которые практически всегда присутствуют в мембранах животных клеток и их органелл. Механизм сенсibilизации липидов к УФ-излучению собственными продуктами окисления состоит в фотоинцировании цепей окисления ненасыщенных жирных кислот свободными радикалами, генерируемыми из гидроперекисей (см. § 4 гл. XVI).

Важной особенностью перекисного фотоокисления липидов в мембранах животных клеток является ингибирование процесса антиоксидантами (например,  $\alpha$ -токоферолом) и зависимость скорости его протекания от структурного состояния мембран, контролируемого, в частности, температурой. Показано, что возрастание степени перекисного окисления липидов при температурах выше 20–25° С, харак-

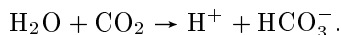
терное для мембран микросом, митохондрий и эритроцитов, связано не с изменением конформации белков, а со структурной перестройкой липидной зоны мембраны, поскольку аналогичный эффект наблюдается и на липосомах, сформированных только из липидов.

При изучении влияния температуры на скорость перекисного фотоокисления липидов и УФ-индуцированное изменение ионной проницаемости эритроцитов, определяемой по скорости их гемолиза, выявлена близкая корреляция в зависимости этих процессов от температуры. Такая же закономерность обнаружена и при изучении влияния кислорода и экзогенных антиоксидантов: удаление  $O_2$  прекращает перекисное фотоокисление липидов в мембранах эритроцитов и резко снижает скорость их гемолиза;  $\alpha$ -токоферол тормозит перекисное фотоокисление липидов и заметно уменьшает степень гемолиза эритроцитов.

При обсуждении возможных путей реализации повреждающего действия перекисного фотоокисления липидов на биомембраны выдвигают предположение о существовании двух различных механизмов. Один из них заключается, вероятно, в нарушении свойств самой липидной зоны мембраны. В пользу этого свидетельствует тот факт, что возрастание ионной проницаемости наблюдается на искусственных липидных мембранах при протекании в них перекисного фотоокисления липидов. Второй механизм, видимо, связан с разрушением белковых SH-групп, необходимых для сохранения барьерных свойств мембран. Косвенно на это указывают данные о более высоком квантовом выходе разрушения тиолов мембран (0,18) по сравнению с таковым в случае УФ-облучения тиолов белков в растворе (0,03).

В отличие от мембран животных клеток, мембраны растительных клеток по критерию изменения их ионной проницаемости обнаруживают значительно более высокую квантовую чувствительность при действии УФ-излучения. Так, увеличение проницаемости плазматической мембраны растительных клеток для различных ионов ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ ) и ее деполяризация наблюдаются уже при таких дозах УФ света (254 нм, 500–2000 Дж/м<sup>2</sup>), которые на порядок ниже доз УФ-излучения, приводящих к изменению барьерных свойств мембран животных клеток.

На культивируемых *in vitro* растительных клетках показано, что УФ-индуцированный выход  $K^+$  во внеклеточную среду идет со скоростью  $5 \cdot 10^{-10}$  мкмоль/мин на клетку и сопровождается выходом в среду  $HCO_3^-$ , образующегося в ходе реакции гидратации  $CO_2$ :



Это, в свою очередь, вызывает уменьшение цитоплазматического рН, зарегистрированного методом <sup>31</sup>P-ЯМР.

Природа отмеченных изменений исследована в экспериментах с изолированными плазматическими мембранами. Оказалось, что наиболее чувствительным к УФ-облучению компонентом является АТФаза, связанная с трансмембранным ионным транспортом, причем ее фотоинаktivация происходит в результате прямого поглощения квантов УФ-света. В пользу этого свидетельствует тот факт, что чувствительность АТФазы к УФ была одинаковой при облучении как мембран, так и раствора очищенного фермента. На основании снятого спектра действия УФ-инаktivации мембранной АТФазы предполагают, что ее хромофором является триптофан.

Таблица XXX.1.

Основные фотодеструктивные реакции и типы повреждений в биологических макромолекулах и мембранах, индуцируемые излучением различных областей УФ-спектра

Вид УФ	Биологические структуры			
	ДНК	белки	мембраны	
			животных клеток	растительных клеток
Коротковолновый УФ (< 290 нм)	Фотодимеризация оснований (пиримидиновые димеры) <sup>1,2)</sup>	Фотолиз триптофановых и цистиновых остатков (радикалы триптофана и цистина, межмолекулярные ковалентные сшивки)	Перекисное фотоокисление липидов (гидроперекиси, ТБК-активные продукты)	Фотоинактивация АТФазы
Длинноволновый УФ (320–400 нм)	Одноцепочечные разрывы	—	Перекисное фотоокисление липидов (гидроперекиси)	—

<sup>1)</sup> Реакция фотообратима, димеры мономеризуются фотолиазой в процессе фотореактивации (см. § 6 этой главы).

<sup>2)</sup> Выход димеров может быть уменьшен при связывании серотонина с ДНК в процессе фотозащиты (см. § 6 этой главы).

Изложенные выше данные об основных фотодеструктивных процессах, протекающих в биологических структурах под действием УФ излучения, суммированы в табл. XXX.1.

**Действие видимого света.** Индуцируемые видимым светом деструктивные реакции в биологических мембранах наиболее эффективно протекают при облучении биологических систем в присутствии экзогенных сенсibilизаторов и кислорода. Фотодинамические эффекты такого рода оказываются столь сильными, что их можно использовать для фототерапии опухолей — метода, в основе которого лежит разрушение опухолевых клеток видимым светом в присутствии порфириновых молекул, способных достаточно избирательно накапливаться в опухолевой ткани.

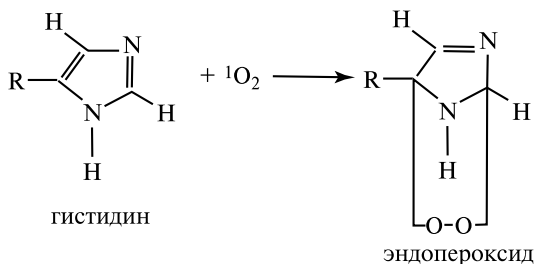
Эффективность фотосенсibilизируемых порфиринами процессов в мембранах определяется в первую очередь чувствительностью к фотоповреждению их главных компонентов — липидов и белков. В липидах высокую чувствительность к сенсibilизированному фотоокислению проявляют ненасыщенные жирные кислоты и холестерин. Процессы сенсibilизированного фотоокисления ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов протекают по механизму свободнорадикального перекисного фотоокисления липидов. Так, при облучении видимым светом эритроцитов больных эритропоэтической протопорфирией, содержащих повышенные концентрации эндогенного протопорфирина, а также тей нормальных эритроцитов в сочетании с экзогенным сенсibilизатором тетрасульфофенилпорфином (ТСФП), в них выявлены характерные продукты перекисного окисления липидов — гидроперекиси и малоновый диальдегид. Как показано в экспериментах с использованием ТСФП, накопление ТБК-активных продуктов продолжается и после помещения облученных образцов в темноту, что отражает инициацию аутоокисления липидов первичными фотопродуктами.

Для выяснения механизма инициации фотосенсибилизируемого ТСФП перекисного окисления липидов исследовано влияние супероксиддисмутазы, каталазы и азида натрия на этот процесс. Оказалось, что ферменты, катализирующие реакции разложения  $\dot{O}_2^-$  и  $H_2O_2$ , не изменяют кинетику накопления ТБК-активных продуктов, тогда как тушитель синглетного кислорода (азид) резко ингибирует процесс. Эти данные можно рассматривать как указание на участие  $^1O_2$  в фотосенсиблированном ТСФП образовании продуктов перекисного окисления липидов, т. е. о реализации в данном случае фотодинамической реакции типа II. Вместе с тем, как показано в модельных экспериментах по облучению липосом в присутствии гематопорфирина, тип фотосенсиблированной реакции окисления липидов может зависеть от соотношения концентраций сенсибилизатора и липидов. Когда оно мало, сенсибилизатор находится в липидной фазе в мономерной форме, и процесс идет в основном по механизму типа II. При относительно больших концентрациях гематопорфирина в липосомах образуются агрегаты сенсибилизатора, и преобладает реакция типа I.

Сенсиблированное фотоокисление липидов вызывает увеличение вязкости липидной фазы мембран, а также их структурные изменения, что приводит к резкому снижению барьерных свойств липидных бислоев.

В мембранных белках фотосенсиблированные изменения проявляется в первую очередь в образовании ковалентных сшивок между различными полипептидными цепями, о чем свидетельствует появление на гель-электрофореграммах высокомолекулярных агрегатов белков. Ряд данных показывает, что эти сшивки не зависят от фотосенсиблированного окисления липидов в мембранах. Так, фотосенсиблированное сшивание периферического белка спектрина происходит примерно с одинаковой скоростью при облучении его раствора и мембран. При помещении облученных образцов в темноту процесс сшивания мембранных белков прекращается, несмотря на продолжающееся аутоокисление липидов. Выход фотосенсиблированных сшивок белков не зависит от добавок антиоксидантов, ингибирующих фотоокисление липидов. Заметное сшивание мембранных полипептидов наблюдается уже при дозах облучения, при которых образование ТБК-активных продуктов обнаружить еще не удается.

В основе сшивания полипептидов лежат фотодинамические процессы, инициируемые главным образом синглетным кислородом. Константы скорости реакции  $^1O_2$  с белками весьма велики ( $10^9-10^{10} M^{-1}c^{-1}$ ), на несколько порядков выше, чем с другими биологически важными молекулами. Эти и обуславливает высокую эффективность повреждения мембранных белков при фотосенсиблизации. Особенно сильно фотоокисляются такие остатки белков, как цистеин, гистидин и триптофан. Именно с окислением этих аминокислотных остатков главным образом связано фотосенсиблированное сшивание белков. В качестве примера приведена схема фотоокисления гистидина.



Фотосенсибилизированные шивки полипептидов в мембранах являются, по видимому, причиной нарушения их транспортных свойств.

Рассмотренные процессы фотосенсибилизированного окисления белков и липидов мембран, приводящие к потере их важнейших функциональных свойств, могут обуславливать гибель клеток при фотодинамическом действии видимого света.

Фотодинамические эффекты наблюдаются и при облучении биологических систем видимым светом без добавленных сенсibilизаторов. Недавно такой эффект подробно исследован на дрожжевых клетках. На основании изучения спектра действия фотоинактивации клеток, обнаружившего близкое сходство со спектром поглощения порфирина, выделенного из плазматических мембран дрожжей, сделано заключение, что этот пигмент выполняет роль эндогенного фотосенсибилизатора. Показано также, что основным инициатором фотодеструктивных реакций, приводящих к нарушению барьерной функции плазматических мембран, является  $^1\text{O}_2$ , фотогенерируемый порфирином. Как установлено в экспериментах с изолированными плазматическими мембранами, фотосенсибилизированное изменение их проницаемости обусловлено главным образом процессом перекисного фотоокисления липидов. На основании зарегистрированного методом ЭПР ограничения подвижности спинового зонда (5-доксилпальмитат) сделан вывод о том, что перекисное фотоокисление липидов сопровождается увеличением вязкости мембраны.

Выше уже отмечалось, что фотодинамические реакции с участием экзогенных сенсibilизаторов порфириновой природы лежат в основе фототерапии опухолей. В последнее время разрабатываются основы нового модифицированного метода фотодинамической терапии, в котором в роли фотосенсибилизатора выступает эндогенный протопорфирин IX.

Свободные фотодинамически активные эндогенные порфирины являются предшественниками на путях синтеза функционально активных металлопорфиринов. Так, протопорфирин IX служит непосредственным предшественником при образовании гемов. Скорость синтеза гемов и, соответственно, интермедиатов порфириновой природы, определяется уровнем активности фермента синтазы 5-аминолевулиновой кислоты. Эта стадия, являющаяся узким местом синтеза гема и находящаяся под контролем со стороны конечного продукта, может быть преодолена при введении в организм экзогенной 5-аминолевулиновой кислоты. Это соединение само по себе не обладает фотодинамической активностью, однако в его присутствии происходит избыточный синтез и внутриклеточное накопление (преимущественно в раковых клетках) достаточных для эффективной фотосенсибилизации количеств протопорфирина IX. Индуцированный биосинтез порфиринов и последующие фотодеструктивные реакции делают также возможным использование 5-аминолевулиновой кислоты в качестве гербицида и инсектицида.