Доклады Академии наук СССР
1955. Том 104, № 6

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ и А. В. УМРИХИНА

ОБРАЗОВАНИЕ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ ПРИ РЕАКЦИИ ФОТОХИМИЧЕСКОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 7 VII 1955)

Следовало ожидать, что элементарный процесс восприятия электрона молекулой хлорофилла (X) в длительно живущем бирадикальном состоянии ([1]) от молекулы-донора (AH), приведет к первичному образованию пары ион-радикалов, в соответствии со схемой, приведенной в нашей работе ([2] а):

$$\cdot X \cdot + AH \rightleftarrows \cdot X^- + \cdot AH^+.$$

Недавно в нашей лаборатории было обнаружено увеличение электропроводности при реакции фотовосстановления ([3]), что, действительно, свидетельствует об образовании ионов в результате фотопроцесса. Однако желательно получить экспериментальные доказательства образования свободных радикалов при этой реакции.

В данной работе мы использовали метод инициирования цепной полимеризации, нашедший применение при исследовании фотохимического образования свободных радикалов в растворах.

В литературе имеются указания о том, что исследованная в наших работах система хлорофилл — аскорбиновая кислота приводит к сенсибилизированной фотополимеризации метилметакрилата ([4]). Было также показано, что ряд красителей в присутствии аскорбиновой кислоты и кислорода воздуха при освещении инициируют полимеризацию ([5]). Целью нашего исследования было установление связи между образованием радикалов и фотовосстановлением хлорофилла и его аналогов. Мы предполагали также исследовать ряд доноров электрона (водорода), не приводящих к заметному накоплению продуктов фотовосстановления, определяемых спектральными методами; можно было думать, что большой «коэффициент усиления» из-за цепного характера полимеризации дал бы возможность обнаружить образование радикалов в таких системах, где спектральные методы оказались недостаточными.

Подготовка реагентов. Хлорофилл, бактериохлорофилл и протохлорофилл выделяли из организмов обычными модификациями хроматографического метода, принятыми в нашей лаборатории.

Реактивный метилметакрилат многократно промывали 10%-м раствором соды (1 : 1) для удаления стабилизатора — гидрохинона, затем отмывали водой и сушили над хлористым кальцием. Завершающая стадия очистки проводилась перед опытом в вакуумной трубке Тунберга. В боковой отвод трубки вводили мономер, из трубки удаляли воздух и освещали светом ртутно-кварцевой лампы ПАРК-2 до начала полимеризации (обычно 10 мин. на расстоянии 15 см от лампы); затем, охлаждая нижнюю часть трубки до —30°, перегоняли в нее мономер из бокового отвода, в котором оставалась тонкая пленка полимера, связывающего примеси.

Фотосенсибилизированная полимеризация в растворе. Опыты проводились по следующей схеме: 2 мл эфирного раствора хлорофилла требуемой концентрации (обычно 10^{-5} мол/л) испаряли в вакууме в трубке Тунберга, затем вводили донор водорода (обычно 5 мг) и 2 мл смеси метилметакрилата с пиридином в отношении 3 : 1, которое, как показали наши опыты, является оптимальным.

Содержимое трубки откачивали вакуумным масляным насосом при энергичном взбалтывании и охлаждении, после чего раствор в трубке освещали красным светом (через фильтр Rg-2) с интенсивностью около 10^6 эрг/см^2 · сек. на установке, состоящей из кинолампы 500 в с конденсором и сосуда, в котором циркулировала вода из термостата с температурой 20°. После реакции 0,5 мл раствора вводили в 5 мл метилового спирта и о количестве выпавшего полимера судили путем нефелометрических измерений по сравнению с темновым контролем. Этот метод дает приближенные результаты и наиболее пригоден при неглубокой полимеризации; большое количество полимера выпадает в виде хлопьевидного осадка.

Опыты с различными концентрациями хлорофилла показали, что увеличение концентрации хлорофилла выше $1{,}5 \cdot 10^{-4}$ мол/л приводит к торможению реакции.

Исследование длительности освещения показало, что значительная полимеризация достигается через 15—30 мин. Столь же эффективным оказалось кратковременное освещение (1 мин.) с последующей темновой выдержкой, при которой происходило развитие цепного процесса. В темноте без предварительного освещения реакция не идет, так же как и при освещении без пигмента.

Испытания ряда доноров водорода привели к следующим выводам. Наиболее активно полимеризация идет в присутствии аскорбиновой и диоксималеиновой кислот. Остальные испытанные соединения приводили к меньшим эффектам; по силе действия их можно расположить в следующий ряд: глютаминовая, щавелевая, яблочная, янтарная, уксусная, пировиноградная, лимонная кислота, глюкоза. В присутствии пирокатехина и фенилгидразина полимеризация вообще не шла, что следует объяснить вторичным ингибирующим действием этих соединений. Без донора водорода также наблюдалось образование небольшого количества полимера. Возможно, что в этом случае растворитель играет роль донора водорода, хотя нельзя считать исключенным возможность инициирования полимеризации бирадикальной формой хлорофилла. Вероятно, однако, что в присутствии активного (как донора электрона) растворителя стационарная концентрация первичной фотовосстановленной формы превосходит стационарную концентрацию пигмента в бирадикальном состоянии.

Чтобы установить связь между образованием радикалов, инициирующих полимеризацию и реакцией фотовосстановления пигмента, мы вводили в реакционную среду акцепторы водорода, быстро реагирующие с фотовосстановленной формой хлорофилла, но не реагирующие с исходными донорами водорода. Согласно работам нашей лаборатории, для этой цели использованы сафранин Т и рибофлавин ([6]).

Действительно, введение в систему хлорофилл — аскорбиновая кислота сафранина Т с коэффициентом погашения 1,0 при 540/мμ и рибофлавина с коэффициентом погашения 1,0 при 445 мμ приводило к подавлению сенсибилизированной полимеризации, возбуждаемой красным светом, который не поглощают сафранин и рибофлавин; вероятно, происходит быстрое диспропорционирование семихинонов — продуктов восприятия электрона и протона молекулами красителей, что приводит к снижению стационарной концентрации радикалов, генерируемых красным светом.

Опыты в эмульсиях. Для того чтобы иметь возможность исследовать ряд растворимых в воде доноров водорода, мы осуществили реакции в гетерогенных системах, где хлорофилл находился в растворенном

состоянии (в каплях метилметакрилата), а донор водорода — в водной эмульсионной среде. Чтобы избежать значительного светорассеяния, которым обладают мутные эмульсии обычного типа, мы разработали способ приготовления прозрачных эмульсий, в которых дисперсионной средой служил 46%-й водный раствор сахарозы, имеющий тот же показатель преломления, что и метилметакрилат. В качестве эмульгатора в большинстве опытов использовали 0,5%-й раствор яичного альбумина в 1/15 *M* Na_2HPO_4.

В вакуумную трубку вводили 2 мл эфирного раствора хлорофилла с коэффициентом погашения $2 \cdot 10^{-5}$ мол/л. После испарения в вакууме эфирного раствора добавляли 2 мл свежеперегнанного метилметакрилата.

В 2 мл раствора яичного альбумина растворяли 2 г сахарозы и 5 мг донора водорода. Полученный раствор приливали к раствору хлорофилла и взбалтывали, а затем «дотитровывали» водой до полной прозрачности. Получалась прозрачная зеленая эмульсия, обладающая характерной красной флуоресценцией хлорофилла. После эвакуирования с охлаждением до —10° в течение 3 мин. (при энергичном встряхивании) эмульсию освещали красным светом в течение 15 мин. в условиях, описанных выше. В случае активной фотополимеризации эмульсия загустевала в форме геля. При менее активной полимеризации эмульсию разрушали добавлением 1 мл ледяной уксусной кислоты с последующим центрифугированием в течение 10 мин. при 3000 *g* для разделения фаз. Прозрачный верхний слой метилметакрилата испытывали на присутствие полимера вышеописанным методом. В этих опытах аскорбиновая кислота и цистеин приводили к весьма энергичной фотополимеризации с гелеобразованием. Введение в систему ряда солей железа, многие из которых в условиях опыта образовывали взвесь основных фосфатов, привело к следующим результатам. Соединения двухвалентного железа — сульфат, соль Мора и калий-оксалат приводили к энергичной полимеризации, тогда как в присутствии соответствующих солей трехвалентного железа полимеризации в условиях опыта не наблюдалось, что свидетельствует о возможности восприятия электрона хлорофиллом от соединений двухвалентного железа.

Мы исследовали участие в реакции цитохрома С, выделенного из сердечной мышцы быка обычным методом Кейлина и Хартри. Раствор цитохрома служил также эмульгатором — в этих опытах не было необходимости добавлять яичный альбумин. В отличие от опытов с неорганическими солями железа, как окисленный, так и восстановленный цитохром приводили к неглубокой полимеризаци. Возможно, что это связано с фотохимическим взаимодействием хлорофилла с цитохромом по схеме, приведенной в нашей работе ([7]). Контрольные опыты в темноте не приводили к полимеризации. В эмульсиях в отсутствие вводимого извне донора наблюдалась незначительная фотополимеризация. Поведение хлорофилла, бактериохлорофилла и протохлорофилла было сходным в большинстве опытов. В опытах с бактериохлорофиллом освещение вели через светофильтр Rg-5.

Возможность использования белков для стабилизации эмульсии привела нас к опытам, при которых в качестве эмульсионной среды использовался зеленый коллоидный раствор вещества зеленых листьев, приготовленный обычным в нашей лаборатории методом (например, ([9])). При взбалтывании «зеленого раствора» с метилметакрилатом последний экстрагирует хлорофилл; освещение красным светом эвакуированного раствора приводило к полимеризации, что указывает на присутствие в «зеленом растворе» доноров водорода, способных к фотохимическому взаимодействию с хлорофиллом.

Об участии кислорода в реакции. На воздухе полимеризация не идет; однако введение около 1% кислорода в трубку после откачивания не препятствует полимеризации. В системе хлорофилл —

донор водорода — кислород происходит энергичное сенсибилизированное окисление донора с практически полным потреблением кислорода ([8]). При этом возможно образование промежуточных продуктов восстановления кислорода (HO_2, H_2O_2), которые могут инициировать полимеризацию.

Мы пытались особо тщательно удалять следы кислорода в системе путем длительного освещения мономера (в боковом отводе трубки) ультрафиолетом в вакууме перед опытом, проводимым в нижней части той же трубки. Однако и в этих условиях сенсибилизованная полимеризация шла столь же энергично. Если допустить все же, что в системе остаются следы кислорода, участвующего в реакции, то образование радикалов при действии красного света, вероятно, идет также через стадию промежуточного фотовосстановления хлорофилла (X), например:

$$X + AH \xrightarrow{h\nu} \cdot X^- + \cdot AH^+ \rightarrow \cdot XH + \cdot A,$$

$$\cdot XH + O_2 \rightarrow X + HO_2\cdot \text{ и т. д.,}$$

на что указывают исследования нашей лаборатории над механизмом сенсибилизированных хлорофиллом реакций ([10]).

Полученные результаты свидетельствуют в пользу тех схем фотосинтеза, согласно которым первичным химическим результатом действия света на хлорофилл является образование свободных радикалов; данные опытов могут быть поставлены в связь с недавно обнаруженным явлением красной хемилюминесценции в листьях и гомогенатах ([11]), являющейся, повидимому, следствием обратных реакций радикалов, образуемых при фотохимических стадиях фотосинтеза.

Заключение. В работе показано образование свободных радикалов при реакции фотовосстановления хлорофилла и его аналогов под действием красной и близкой инфракрасной области спектра. В качестве донора электрона при фотореакции с хлорофиллом может быть использован широкий круг биохимически важных соединений, в том числе соединения двухвалентного железа.

В заключение приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Терешину и проф. Х. С. Багдасарьяну за советы и обсуждение работы.

Институт биохомии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
28 VI 1955

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. Н. Терешин, Изв. АН СССР, сер. биол., № 3, 369 (1947); Фотохимия красителей, Изд. АН СССР, 1947. [2] а) А. А. Красновский, ДАН, 60, 421 (1948); б) А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, 96, 1025 (1954). [3] В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, 103, № 1 (1955). [4] N. Uri, J. Am. Chem. Soc., 74, 5808 (1952). [5] G. Oster, Nature, 173, 300 (1954). [6] А. А. Красновский, ДАН, 61, 91 (1948); А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, 67, 325 (1949); 73, 1239 (1950); А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, 87, 109 (1952); В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, ДАН, 98, 107 (1954). [7] А. А. Красновский, ДАН, 103, № 2 (1955). [8] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, 58, 1087 (1947). [9] А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, 104, № 3 (1955). [10] А. А. Красновский, Сборн. докл. Вопросы химической кинетики, катализа и реакционной способности, Изд. АН СССР, 1955. [11] B. L. Strehler, W. A. Arnold, J. Gen. Physiol., 34, 809 (1951); W. Arnold, T. Davidson, J. Gen. Physiol., 37, 677 (1954).