

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА ПРИ ФОТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ

Ф. Ф. Литвин, Ю. А. Владимиров, А. А. Красновский

Изучение люминесценции хлорофилла внесло существенный вклад в современные представления о первичных физических процессах, следующих непосредственно за актом поглощения света: о запасании, миграции и растрате энергии поглощенного кванта. Однако для фотосинтеза решающее значение имеет последующее превращение энергии кванта света в энергию химических соединений, которое осуществляется в процессе фотохимических реакций. Исследование хемилюминесценции в ходе реакций, обратных фотохимическим, представляется одним из наиболее перспективных путей познания природы и механизмов прямых фотохимических процессов фотосинтеза. Хемилюминесценция может быть обусловлена продуктами, возникающими на разных стадиях превращения энергии света в энергию химических соединений, поэтому ее всестороннее изучение открывает новые возможности исследования всей цепи последовательных процессов, связывающих первичный фотофизический акт с биохимическими ферментативными реакциями.

Хемилюминесценция хлорофилла и фталоцианина магния в растворах была обнаружена сравнительно давно, однако наблюдать ее удавалось лишь в жестких условиях (в кипящем тетралине, содержащем перекиси), в которых происходило разрушение молекулы пигмента ^{1,2}. Позднее хемилюминесценция хлорофилла была обнаружена в щелочном растворе, содержащем альдегиды. Явление также сопровождалось нарушением целостности молекулы и, по мнению самих авторов, вероятно, имеет интерес лишь с точки зрения химии хлорофилла ³.

Интерес биологов и физиков к явлению хемилюминесценции при фотосинтезе вызван появлением работ Стрелера и Арнольда и др., которые обнаружили и исследовали длительное послесвечение фотосинтезирующих организмов и суспензий хлоропластов ^{4,5}. В этих работах убедительно показана связь наблюдавшегося свечения с фотосинтезом, позволившая предположить, что это свечение было хемилюминесценцией ^{4,5}. Однако остаются невыясненными механизмы процессов наблюдаемого явления и прежде всего роль самого хлорофилла. Остается открытым основной вопрос, вызвана ли хемилюминесценция химическими превращениями хлорофилла и его фотопродуктов или же хлорофилл лишь высвечивает кванты, образующиеся в процессе рекомбинации других продуктов фотосинтеза ⁶. В связи с этим нами была поставлена задача исследовать хемилюминесценцию при фотохимических реакциях в модельной системе, содержащей хлорофилл.

В качестве такой реакции была избрана реакция обратимого фотовосстановления хлорофилла, которая, как известно, лежит в основе фотосенсибилизирующего действия хлорофилла в растворе ⁶. Исследовалась также хемилюминесценция хлорофилла при фотоокислении в растворе, послесвечение и «термовысвечивание» пленок пигментов и хлоропластов.

При исследовании хемилюминесценции принципиальное значение приобретает чувствительность методов ее измерения, что обусловлено чрезвычайно низкой интенсивностью свечения. Поэтому измерения производились на установке для исследования сверхслабых свечений, собранной на основе фотоумножителя, охлаждаемого жидким азотом, и работающей в режиме счетчика фотонов ⁷.

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ПРИ РЕАКЦИИ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛА

При реакциях обратимого окисления фотовосстановленных форм хлорофилла кислородом воздуха нами была обнаружена хемилюминесценция.

Фотовосстановление хлорофилла ($a+b$) в пиридиновом растворе в присутствии аскорбиновой кислоты производилось в вакуумной трубке Тунберга. Раствор эвакуировался с помощью масляного насоса и освещался в течение 5 минут при комнатной температуре фокусированным светом 500-ваттной лампы накаливания через водный (тепловой) и красный светофильтр (КС-2 или КС-10).

После освещения трубка Тунберга помещалась перед окном сосуда Дьюара с фотоумножителем, и в темноте, при сильном перемешивании, производился пуск

воздуха и добавление раствора аммиака, ускорявшего обратные реакции⁸. Затухание хемилюминесценции регистрировалось в интервале от 5 сек. до 5 мин. от момента пуска кислорода.

Кривая затухания хемилюминесценции при окислении фотовосстановленных форм приведена на рис. 1. Обращает внимание сходство этой кривой с кривой затухания хемилюминесценции листа фасоли, полученной в одинаковых условиях освещения и измерения, а также тот факт, что хемилюминесценция раствора лишь в 4 раза уступает по интенсивности свечению листа (при этом следует учитывать меньшую концентрацию хлорофилла в растворе).

Результаты более детальных исследований наблюдавшихся процессов можно свести к следующему:

1) Хемилюминесценция обусловливается обратными реакциями окисления фотовосстановленных форм хлорофилла. Для ее появления необходим каждый из факторов, существенных для фотовосстановления (хлорофилл, аскорбиновая кислота, освещение

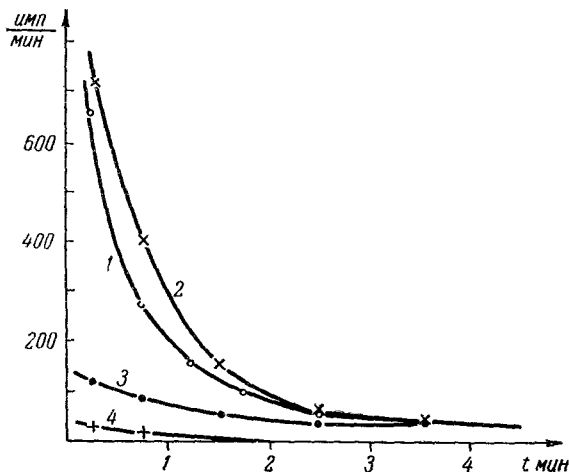


Рис. 1. Послесвечение листьев и хемилюминесценция раствора хлорофилла.

1—зеленый лист фасоли, 2—хемилюминесценция при окислении фотовосстановленных форм хлорофилла (5 мл пиридинового раствора хлорофилла ($D=1$ при 668 мμ) + 2,4 мг аскорбиновой кислоты, после освещения пуск O_2 и добавление 0,1 мл 10%-ного раствора аммиака), 3—то же, но с 0,1 мг аскорбиновой кислоты, 4—то же но без аскорбиновой кислоты. По ординате—относительная интенсивность свечения—число импульсов за 1 мин. Масштаб для кривой 1 уменьшен в 4 раза.

раствора в вакууме). В отсутствие фотовосстановления при освещении растворов в вакууме хемилюминесценция либо весьма слаба, либо не наблюдается. С увеличением количества аскорбиновой кислоты свечение усиливается. Хемилюминесценция появляется только при пуске кислорода после фотовосстановления хлорофилла и резко усиливается при добавлении аммиака, ускоряющего обратные реакции фотовосстановленных форм хлорофилла. Кривые кинетики хемилюминесценции при разных условиях проведения фотовосстановления и обратных реакций изображены на рис. 1 и 2.

Хемилюминесценция наблюдалась нами также в случае фотовосстановления чистого хлорофилла a и его аналога феофитина a .

Существенно, что эффект сохраняется при замене аскорбиновой кислоты другим донатором водорода—фенилгидразином. При использовании фенилгидразина (0,2 мл на пробу) интенсивность свечения значительно превышает описанные выше эффекты с аскорбиновой кислотой.

Добавление к раствору красителей (метиловый красный и нейтральный красный), которые, являясь акцепторами водорода, подавляют фотовосстановление⁶, приводило к подавлению хемилюминесценции.

2) Квант хемилюминесценции, по-видимому, высвечивается молекулой хлорофилла. Измерения спектра хемилюминесценции в настоящее время не удалось осуществить ввиду ее низкой интенсивности. Однако опыты со светофильтрами показали, что спектр хемилюминесценции лежит в спектральной области люминесценции хлорофилла (665—800 мμ), пропускаемой светофильтром КС-13. Светофильтр СЗС-10, пропускающий в широкой спектральной области от 400 до 660 мμ, пропускал не более 1,5% света хемилюминесценции.

3) Ответственной за хемилюминесценцию, по-видимому, является не вторичная («красная») фотовосстановленная форма хлорофилла, а какие-то иные промежуточные

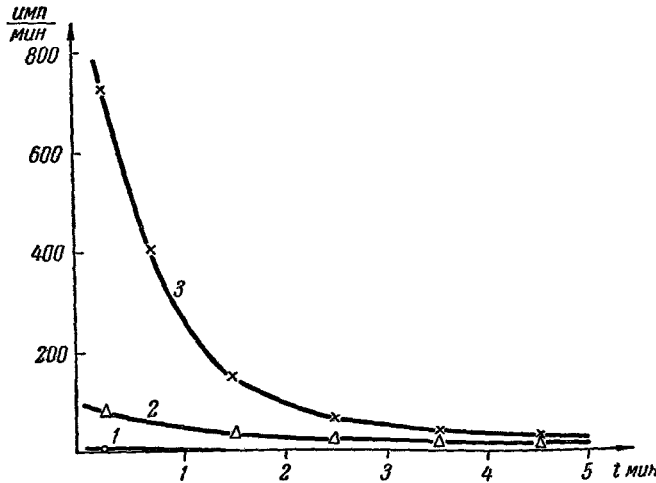


Рис. 2. Зависимость хемилюминесценции от кислорода и аммиака.

1—послесвечение раствора сразу после фотовосстановления без O_2 , 2—то же $+O_2$, 3—то же $+O_2+0,1$ мл аммиака. Остальные условия те же, что на рис. 1, кривая 2.

соединения, лежащие на пути окисления от вторичной формы к хлорофиллу. Прежде всего наблюдения показали отсутствие пропорциональности между глубиной фото-

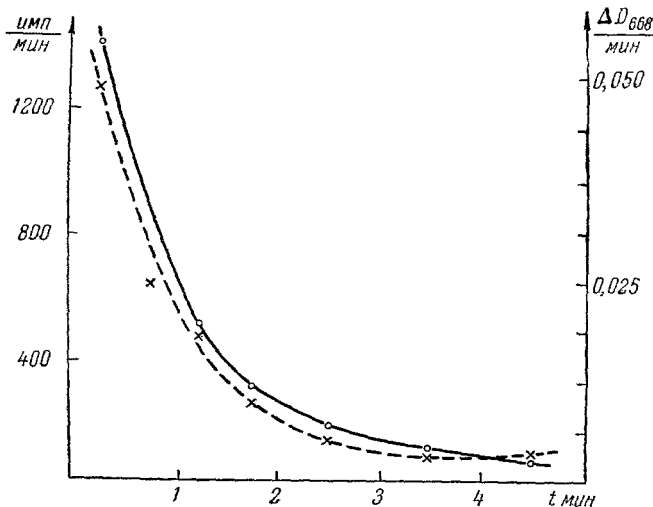


Рис. 3. Кинетика хемилюминесценции и скорость изменения оптической плотности (D_{668} м.м.к) при окислении фотовосстановленных форм хлорофилла.

Сплошная кривая—хемилюминесценция (условия те же, что на рис. 1 кривая 2), пунктир—скорость изменения оптической плотности раствора при $\lambda=668$ м.м.к $\left(\frac{D_{668} \text{ м.м.к}}{\text{время}} \right)$.

восстановления и интенсивностью хемилюминесценции. Хемилюминесценция наблюдалась даже в тех опытах, где фотовосстановление феофитина *a* проводилось при температуре -40°C , т. е. в таких условиях, когда вторичная фотовосстановленная

форма пигмента вообще не образуется. Наконец, в пользу того, что хемилюминесценция обусловлена окислением промежуточных фотовосстановленных форм, свидетельствуют результаты сопоставления затухания хемилюминесценции с изменением оптической плотности раствора. Эти измерения в ходе обратных реакций окисления фотовосстановленных форм проводились на регистрирующем спектрофотометре СФ-2М в условиях опытов, идентичных с опытами по исследованию хемилюминесценции. Измерение оптической плотности раствора после пуска кислорода и аммиака проводилось в максимуме поглощения вторичной фотовосстановленной формы 525 мкм и в красном максимуме поглощения хлорофилла *a*.

Было обнаружено, что при пуске кислорода и аммиака происходит практически мгновенное (менее чем за 5 сек.) уменьшение поглощения при 525 мкм, которое не сопровождалось вспышкой хемилюминесценции. В дальнейшем ходе обратных реакций в интересующем нас интервале времени (от 5 сек. до 5 мин.) поглощение при 525 мкм остается неизменным (с точностью $\pm 0,002$).

В противоположность этому увеличение оптической плотности в максимуме поглощения хлорофилла при его регенерации из фотовосстановленных форм не заканчивается быстрой стадией (до 5 сек.), а продолжается с меньшей скоростью в течение всего интервала времени от 5 сек. до 5 мин. Кривая скорости изменения оптической плотности в максимуме поглощения хлорофилла и кривая затухания хемилюминесценции весьма близки по форме (рис. 3). Эти данные свидетельствуют о том, что хемилюминесценция обусловлена окислением промежуточных форм пигмента, лежащих на пути от вторично восстановленной формы к хлорофиллу.

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ПРИ ФОТООКИСЛЕНИИ ХЛОРОФИЛЛА В РАСТВОРЕ

Исследовались пиридиновые растворы смеси хлорофиллов *a* и *b*, чистого хлорофилла *a* и феофитина *a*. Неэвакуированные растворы освещались так же, как описано выше, и затем (через 5 сек.) измерялось их свечение, пропускаемое красным светофильтром КС-13. На рис. 4 изображены кривые затухания хемилюминесценции

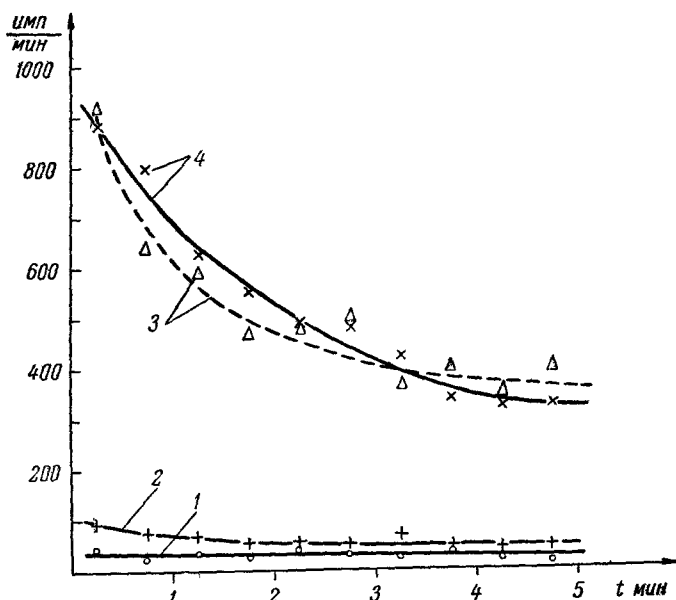


Рис. 4. Хемилюминесценция раствора хлорофилла в пиридине.

1—после освещения раствора в вакууме, 2—после освещения раствора в вакууме с последующим пуском воздуха, 3—после освещения неэвакуированного раствора, 4—то же, но с добавлением олеиновой кислоты перед освещением.

после освещения растворов хлорофилла на воздухе. Обращает на себя внимание быстрое затухание свечения в первые минуты и наличие длительной, медленно затухающей компоненты.

Добавление олеиновой кислоты в освещаемые растворы не оказывало дополнительного эффекта. Растворы, освещенные в вакууме, и неосвещенные растворы на

воздухе давали незначительные эффекты, сравнимые с величиной фона. Слабая хемилюминесценция наблюдалась при освещении растворов в вакууме с последующим пуском воздуха. Интересно отметить, что в некоторых случаях добавление к раствору перед освещением таких веществ, как аскорбиновая кислота, красители и др., усиливало хемилюминесценцию.

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА В ПЛЕНКАХ И ХЛОРОПЛАСТАХ

Известно, что в фотосинтезирующих клетках хлорофилл находится в состоянии, отличном от его состояния в растворе. Высокая концентрация пигмента, упорядоченность и наличие многокомпонентного химически разнородного окружения—все это, по-видимому, может сказаться на хемилюминесценции хлорофилла в этих условиях. В связи с этим представляет интерес исследовать хемилюминесценцию хлорофилла в таких модельных системах, как пленки чистых пигментов, пленки, полученные из экстрактов листьев, и пленки хлоропластов. Арнольд и Шервуд обнаружили свечение пленок хлоропластов, наблюдавшееся ими после освещения пленок с последующим нагреванием (термовысвечивание)⁹. Это явление объяснялось авторами запасанием электронов в полупроводниковых ловушках, с последующим высвечиванием энергии при нагревании. Один из нас указал на то, что этот эффект может быть связан с хемилюминесценцией хлорофилла в пленках¹⁰. В более поздней работе Арнольд и Шервуд допускали также возможность объяснения термовысвечивания хемилюминесценцией¹¹. В связи с этим представляют интерес наблюдения этих авторов о том, что в присутствии кислорода (но не в атмосфере азота) пленки хлоропластов получают заряд, т. е. запасают энергию¹¹. В целях выяснения природы явления представляло интерес исследовать наряду с послесвечением также и «термовысвечивание» пленок хлоропластов и пигментов.

Пленки хлорофилла (*a*+*b*) получались растворением кристаллического препарата в этиловом спирте с последующей отгонкой растворителя под вакуумом в трубке Тунберга. После получения достаточно равномерной пленки на внутренней поверхности трубки Тунберга в течение 15—20 мин. проводилась дополнительная эвакуация для удаления остатка растворителя. Описанный способ позволял исследовать свечение пленок в различной среде (вакууме, кислороде, азоте) и при разных температурах. Спиртовые экстракты получены из листьев сахарной свеклы и фасоли при растирании их в ступке с добавлением CaSO_3 . Пленки из них приготавливались описанным выше способом.

Для получения пленок из гомогенатов листьев сахарной свеклы или фасоли растирались в ступке на холоду при добавлении небольшого количества буферного раствора ($1/15 M \text{Na}_2\text{HPO}_4$). Гомогенат отжимался через полотно и переносился в трубку Тунберга для получения пленки. Отдельные опыты проводились с суспензией хлоропластов, отмытых дистиллированной водой. Полученные пленки освещались через водный (тепловой) и красный (КС-2) светофильтр фокусированным светом 500-ваттной лампы накаливания. Через 5—10 сек. образцы помещались перед окошком фотоумножителя, и их свечение при комнатной температуре регистрировалось через интервалы в 10 сек. в течение 3 мин. Затем трубка Тунберга нагревалась специальным нагревателем до температуры 80° С. Температура устанавливалась в течение 15 сек.,

Таблица I

Послесвечение и термовысвечивание пленок, освещавшихся при комнатной температуре

Материал для приготовления пленки	Газовая среда при освещении	Послесвечение, имп/3 мин. $\times 10^3$	Термовысвечивание, имп/6 мин $\times 10^3$
Свежий гомогенат листьев сахарной свеклы	вакуум	1,00	5,64
Та же пленка после повторных освещений		0,09	0,71
Та же пленка	кислород	1,02	10,20
Спиртовый экстракт из листьев сахарной свеклы	вакуум	0,06	1,75
Та же пленка	кислород	1,30	4,87
Спиртовый раствор хлорофиллов <i>a</i> + <i>b</i>	вакуум	0,06	0,96
Та же пленка	кислород	0,14	0,97

после чего на 5—12-й минуте после освещения измерялось термовысвечивание пленок. Результаты опытов с пленками пигментов и хлоропластов можно свести к следующему:

1) На всех типах пленок обнаруживается как свечение при комнатной температуре, затухающее через 5 мин. после освещения, так и термовысвечивание, обнаруживающееся при последующем нагревании образца. Эффект незначителен у пленок чистых пигментов, более выражен для пленок, полученных из экстрактов, и максимален для пленок хлоропластов (см. таблицу I и рис. 5).

2) Послесвечение при комнатной температуре и в особенности термовысвечивание существенно зависят от наличия кислорода при освещении. В пленках хлоропластов и экстрактов, повторно освещавшихся в вакууме, послесвечение и термовысвечивание приобретают фоновый характер. При освещении в присутствии кисло-

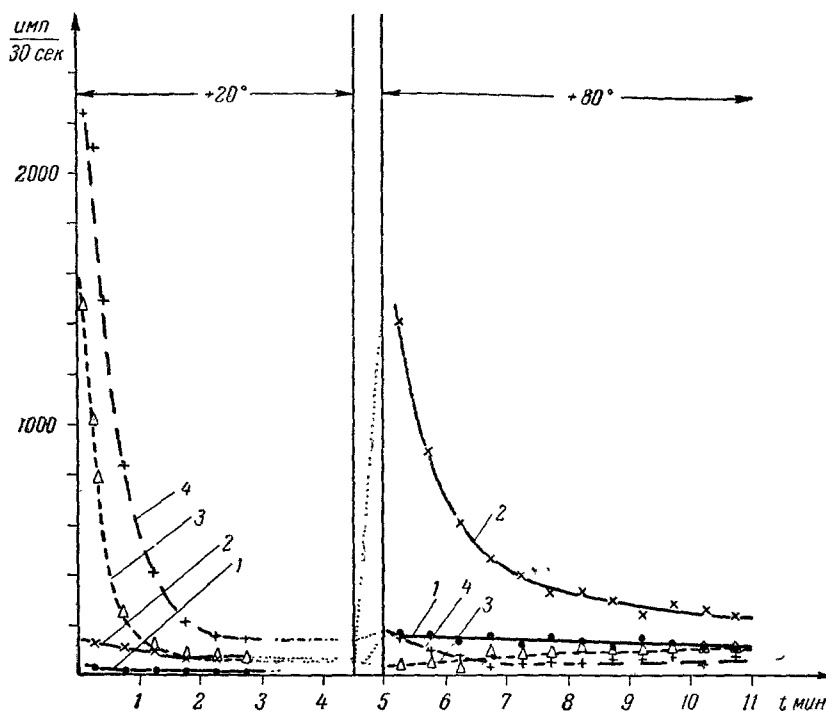


Рис. 5. Послесвечение и термовысвечивание пленок гомогенатов листьев сахарной свеклы.

1—пленка, освещавшаяся при комнатной температуре в вакууме, 2—то же при освещении в кислороде, 3—пленка, освещенная в кислороде при -196°C , 4—пленка освещенная в вакууме при -196°C .

рода в этих пленках появляется интенсивное послесвечение и термовысвечивание. Это свечение не уменьшается при многократных повторениях опыта в кислороде. Последующая эвакуация трубки или замена кислорода азотом приводит снова к падению интенсивности свечения до уровня фона небольшого по величине и почти постоянного во времени.

3) Свежеприготовленные пленки хлоропластов, освещенные в первый раз, обнаруживают даже в вакууме интенсивное послесвечение при комнатной температуре и термовысвечивание, которые однако исчезают при последующих освещениях пленки в отсутствие кислорода. По-видимому, это явление объясняется тем, что свежеприготовленные пленки содержат некоторое количество окислителей, запас которых исчерпывается при повторных освещениях.

4) Термовысвечивание пленок хлоропластов наблюдалось, если образцы освещались в кислороде при температурах $+20^\circ\text{C}$ и -55°C , но отсутствовало, когда пленка освещалась при температуре жидкого азота, что соответствует наблюдениям Арнольда и Шервуда⁹.

5) Если освещать пленки хлоропластов при температуре жидкого азота, то у них появляется очень интенсивное быстро затухающее послесвечение, которое в противоположность послесвечению при комнатной температуре не активировалось, а

по-видимому, даже угнеталось кислородом. Весьма вероятно, что это низкотемпературное послесвечение, протекающее по уравнению первого порядка, обусловлено высвечиванием энергии, запасенной на триплетных уровнях—возможность, на которую указывал А. Н. Теренин¹².

ОБСУЖДЕНИЕ

При обсуждении явления послесвечения фотосинтезирующих организмов Стрелером и сотрудниками была предложена схема, согласно которой высвечивание кванта света происходит при обратных реакциях гипотетических первичного восстановителя и первичного окислителя⁵. Хлорофилл, по мнению этих авторов, не ответствен за хемилюминесценцию, так как он не принимает прямого участия в химических реакциях фотосинтеза и выполняет лишь роль чисто физического сенсibilизатора, не изменяясь химически. Основной аргумент, приводимый авторами в подтверждение этих взглядов, основывается на результатах измерений дифференциальных спектров фотосинтезирующих организмов, при освещении которых не удавалось обнаружить падения поглощения в красном максимуме хлорофилла, которое бы соответствовало хорошо известному увеличению поглощения в области 520 мμ.

Однако в недавней работе¹³ Колеман и Рабинович обнаружили наличие такого параллелизма между увеличением поглощения в области 520 мμ и падением его в максимумах хлорофилла при освещении фотосинтезирующих клеток (хлореллы). Эти эффекты рассматриваются авторами как результат фотовосстановления хлорофилла, осуществляющегося в живой клетке.

С точки зрения схемы Стрелера трудно объяснить также без дополнительных допущений тот весьма существенный факт, что длительное послесвечение при фотосинтезе по спектру совпадает с флуоресценцией хлорофилла. Обнаруженная нами хемилюминесценция при окислении фотовосстановленных форм также, по-видимому, принадлежит хлорофиллу.

Результаты, полученные нами в опытах с фотовосстановлением и с фотоокислением хлорофилла в растворе, позволяют, по нашему мнению, сделать вывод о том, что длительное послесвечение листьев, фотосинтезирующих организмов и суспензий хлоропластов, исследовавшееся Стрелером, Арнольдом и сотрудниками, может быть объяснено хемилюминесценцией хлорофилла и продуктов его фотовосстановления при их окислении в ходе обратных реакций фотосинтеза. Этот вывод согласуется с представлениями о непосредственном химическом участии молекул хлорофилла в реакциях, связанных с переносом электронов при фотосинтезе.

В опытах с пленками было обнаружено, что послесвечение и термовысвечивание пленок хлоропластов зависят от присутствия кислорода при освещении. Это обстоятельство, а также тот факт, что термовысвечивание отсутствует при освещении образцов при температуре жидкого азота, свидетельствуют о химической природе процессов, вызывающих свечение. По-видимому, наблюдаемые факты лучше согласуются с представлением о запасающей энергии квантов хлоропластами не в полупроводниковых ловушках электронов^{9,11}, а в виде богатых энергией продуктов фотохимических реакций. Существование нескольких значений энергии активации процесса термовысвечивания, свидетельствующее, по мнению Арнольда и Шервуда, в пользу полупроводникового механизма свечения (мультиплетность уровней ловушек), может быть объяснено с точки зрения хемилюминесценции наличием нескольких реакций, скорость которых в различной степени зависит от температуры.

Таким образом, длительное послесвечение фотосинтезирующих клеток и тканей гомогенатов, хлоропластов, и растворов пигментов, а также термовысвечивание хлоропластов имеет, вероятно, общую природу, т. е. обусловлено хемилюминесценцией хлорофилла, хотя конкретные механизмы процессов, по-видимому, различны в разных случаях.

ВЫВОДЫ

1. Обнаружена и исследована красная хемилюминесценция при обратном окислении промежуточных фотовосстановленных форм хлорофилла и хемилюминесценция при освещении растворов хлорофилла на воздухе.

2. Исследовано послесвечение и термовысвечивание пленок хлоропластов, экстрактов и чистых пигментов и зависимость этих эффектов от температуры и наличия кислорода при освещении. Затухающее термовысвечивание и послесвечение наблюдается только при наличии кислорода при освещении. Термовысвечивание не происходит, если пленки хлоропластов освещаются при температуре жидкого азота. В этих условиях возникает интенсивное послесвечение не активирующееся кислородом.

3. Можно полагать, что длительное послесвечение фотосинтезирующих клеток и тканей, суспензий хлоропластов и растворов пигментов, а также термовысвечивание хлоропластов имеют общую природу, т. е. обусловлены хемилюминесценцией фотопродуктов, хлорофилла, хотя конкретные механизмы, очевидно, различны в разных условиях.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. I. H. Helberger, *Naturwissenschaften* **26**, 316 (1938).
 2. P. Rothmund, *J. Amer. Chem. Soc.* **60**, 2005 (1938).
 3. A. G. Ferrari, B. L. Strehler, W. E. Arthur, *Research in Photosynthesis*, Inter. N. Y. 1957, p. 45.
 4. B. L. Strehler, W. H. Arnold, *J. Gen. Physiol* **34**, 809 (1951).
 5. B. L. Strehler, V. H. Lynch, *Arch. Biochem. and Biophys.* **70**, 527 (1957).
 6. А. А. Красновский, *Журн. физ. хим.* **30**, 968 (1956); *J. Phys. Chem.* **62** (1958), 968.
 7. Ю. А. Владимиров, Ф. Ф. Литвин, *Биофизика* **4**, 601 (1959).
 8. А. А. Красновский, Е. В. Пакшина, *ДАН СССР* **120**, 58 (1958).
 9. W. H. Arnold, H. K. Sherwood, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **43**, 105 (1957).
 10. А. А. Красновский, *Биофизика* **4**, 3 (1959).
 11. W. H. Arnold, H. K. Sherwood, *J. Phys. Chem.* **63**, 2 (1959).
 12. А. Н. Теренин, *Acta Physicochem. USSR* (1943).
 13. J. W. Coleman, E. Rabinowitch, *J. Phys. Chem.* **63**, 30 (1959).
-