

БИОФИЗИКА

УДК 581.132:58.035

**ВЛИЯНИЕ КИСЛОРОДА НА ЭЛЕКТРОННЫЙ ТРАНСПОРТ  
 В ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОМ АППАРАТЕ ЗЕЛЕННОГО ЛИСТА**

А. Вашарош (Венгрия), М. К. Солнцев, А. К. Кукушкин, В. А. Караваяев

(кафедра биофизики)

**Введение.** Впервые термолюминесценцию (ТЛ) зеленых растений наблюдали Арнольд и Шервуд в 1957 г. (цит. по [1]). С тех пор это явление активно изучается, высказываются различные гипотезы о механизме возникновения ТЛ, однако до сих пор не существует единого мнения о природе разноименных зарядов, ответственных за ТЛ.

Охлаждая образцы, облучая их при низких температурах, затем быстро замораживая и медленно нагревая, можно зарегистрировать излучение света листьями и изолированными хлоропластами при различных значениях температуры.

Существующие представления о механизме возникновения ТЛ в фотосинтезирующих объектах можно суммировать следующим образом. После возбуждения светом специального вида хлорофилла  $a_2$  [2]

пигментного комплекса фотосистемы 2, P 680, на каком-то промежуточном этапе происходит высокоэффективное разделение зарядов [1], и возбужденное состояние P680\*,

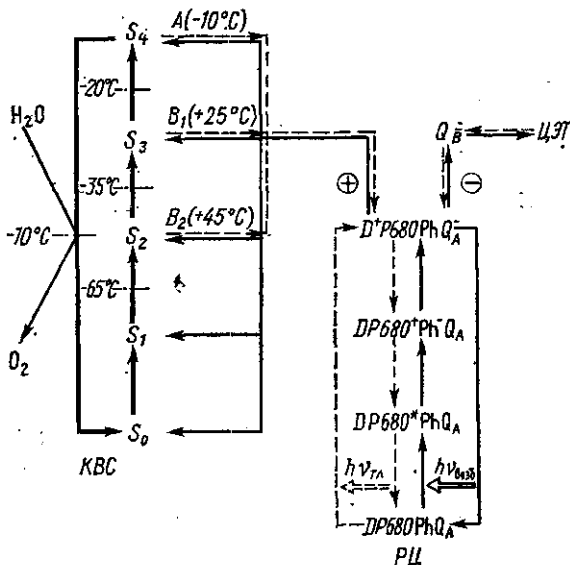


Рис. 1. Схема модели, объясняющей механизм возникновения ТЛ (по [2, 3, 5, 6]): P680 — специальный вид хлорофилла  $a_2$ , KBC — кислород-выделяющая система, PЦ — реакционный центр, D — переносчик электронов между KBC и P680, Ph — феофетиновая молекула,  $Q_A$  и  $Q_B$  — первичный и вторичный хиноновые акцепторы, — — — — температура, при которой блокируется переход из  $S_i$  в  $S_{i+1}$ -состояние (объяснение  $S_i$ , A,  $B_1$ ,  $B_2$  — в тексте)

перехода в заряженное P 680+, восстанавливает первичный акцептор цепи электронного транспорта (ЦЭТ) через феофетиновые (Ph), а возможно, и некоторые другие молекулы. Мигрируя на P680+ с кислород-выделяющей системы (KBC) через промежуточные переносчики (D),

электрон возвращает ему нейтральность [2—5] (рис. 1). Возбуждение  $P680$  есть следствие реакции рекомбинации электронов из ЦЭТ с положительными дырками от КВС [2, 3]. ТЛ возникает в результате испускания кванта света при переходе  $P680^*$  в основное состояние.

В большинстве работ [1—8] по изучению ТЛ на ЦЭТ влияли ингибиторами электронного транспорта и кофакторами циклического фосфорилирования. В связи с тем, что при объяснении механизмов возникновения ТЛ все большую роль приписывают КВС [2—6], нам представлялось важным провести прямые эксперименты по изучению влияния концентрации  $O_2$  на ТЛ зеленого листа.

**Материалы и методика.** Опыты проводились на листьях бобов *Vicia faba* (сорт «Русские черные»). Растения выращивались в комнате, в гидропонических условиях на растворе Кнопа, при искусственном освещении 14 ч в сутки лампами накаливания общей мощностью 300 Вт с расстояния 40—50 см. Использовались высечки листьев растений примерно 20-дневного возраста. Установка для изучения ТЛ достаточно подробно описана в работе [1]. Нами были сделаны изменения в вакуумной системе установки для подвода различных газов в криостат. Охлаждали образцы жидким азотом. Система нагревания обеспечивала достаточно линейную скорость нагрева образца: примерно  $20 \text{ град} \cdot \text{мин}^{-1}$  в интервале от  $-10$  до  $+80^\circ\text{C}$  (именно в этом интервале температур высвечиваются пики ТЛ).

Стандартный опыт проводили следующим образом. Лист адаптировали к темноте в криостате в течение 10 мин при комнатной температуре, затем его охлаждали до температуры облучения ( $-50^\circ\text{C}$ ). Освещение высечки лампой накаливания КГМ-30-300 (видимая область,  $2 \text{ мВт/см}^2$ ) в течение 5 мин обеспечивало «насыщение» излучаемой образцом светосуммы. После быстрого охлаждения листа до температуры жидкого азота начинали медленно его нагревать, доводя температуру до  $+80^\circ\text{C}$ . В опытах с газами во время адаптации из криостата выкачивали атмосферный воздух, доводя давление до 25 Па (форвакуумный насос включали на 20—30 с), затем впускали газ. Во избежание попадания атмосферного воздуха в криостат газы подавали под давлением немного выше атмосферного.

В работе использовались эталонные газовые смеси фирмы «Radekis» (ВНР). Смесь 1: 78,8%  $N_2$ , 12,1%  $O_2$  и 9,1%  $CO_2$ . Смесь 2: 90,4%  $N_2$  и 9,9%  $CO_2$ . Другие газы:  $O_2$ ,  $CO_2$ , He, Ag и Xe были отечественного промышленного производства.

**Результаты и обсуждение.** Сравнение наших результатов с результатами, полученными различными авторами [1—6], показывает примерное совпадение температур максимумов пиков ТЛ. Для обозначения пиков, полученных нами, будем пользоваться сокращениями, предложенными в работе [6]: А-пик ( $-10^\circ\text{C}$ ),  $B_1$ -пик ( $+25^\circ\text{C}$ ),  $B_2$ -пик ( $+40^\circ\text{C}$ ) и С-пик ( $+55^\circ\text{C}$ ). Эти пики были зарегистрированы при скорости нагрева  $30 \text{ град} \cdot \text{мин}^{-1}$ . Когда  $B_1$ - и  $B_2$ -пики плохо различимы, будем обозначать их буквой В.

Характерная кривая стандартного (контрольного) опыта приведена на рис. 2, кривая 1. На ней явно выделяются три пика ТЛ с максимумами при температурах 0, 21 и  $52^\circ\text{C}$ . Обозначим их А-, В- и С-пик соответственно. Отличия от результатов работы [6] по температурам максимумов можно отнести за счет различий в скорости нагрева. Как известно из теории ТЛ, подтвержденной экспериментально, при увеличении скорости нагрева образца максимумы пиков ТЛ смещаются в область более высоких температур [9, 10].

В дальнейшем нам понадобится модель Кока функционирования

КВС, которая достаточно подробно изложена в [6]. Белковый комплекс, выделяющий кислород, может находиться в основном  $S^0$  и четырех окисленных состояниях:  $S^+$ ,  $S^{++}$ ,  $S^{+++}$ ,  $S^{++++}$  соответственно

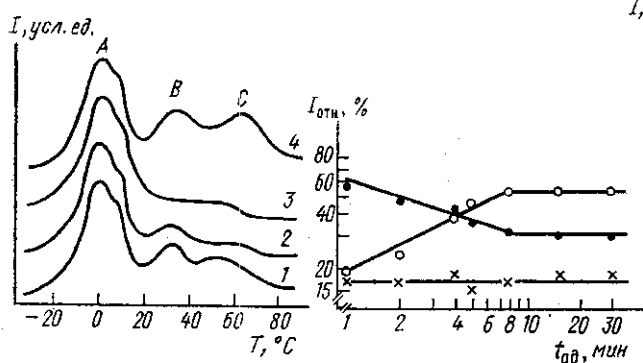


Рис. 2. Характерные кривые ТЛ, зарегистрированные в присутствии атмосферного воздуха (контрольный опыт) (1), смеси 1: 78,8%  $N_2$ , 12,1%  $O_2$  и 9,1%  $CO_2$  (2), смеси 2: 90,1%  $N_2$  и 9,9%  $CO_2$  (3), чистого кислорода (4)

Рис. 3. Зависимость интенсивности пиков ТЛ (по отношению к суммарной интенсивности ТЛ) от времени адаптации образца к темноте, в двойном логарифмическом масштабе: ● — А-пик, ○ — В-пик и × — С-пик

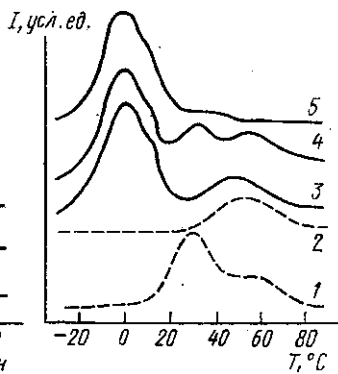


Рис. 4. Характерные кривые термолюминесценции: пунктир — для образцов, не облученных после темновой адаптации, в атмосферном воздухе (1) и в бескислородной среде (2); сплошные кривые — для образцов, обработанных DCMU, в атмосферном воздухе (3) и в бескислородной среде (5), 4 — контрольный опыт с введением  $H_2O$  в жилку листа

(сокращенные обозначения  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S_4$  и основное  $S_0$ ) (цит. по [6]). Согласно [3], за А-пик ответственна реакция рекомбинации положительных дырок с ферментативного комплекса в  $S_4$ -состоянии и электронов с первичного хинонового акцептора  $Q_A$  (см. рис. 1).

С другой стороны, авторы [2] на основании [4] считают, что после двух возбуждающих вспышек света система ферментов КВС переходит из  $S_0$ - и  $S_1$ - в  $S_2$ - и  $S_3$ -состояния, и излучающийся А-пик есть результат реакции рекомбинации положительных дырок с ферментативного комплекса в  $S_2$ -состоянии с электронами с  $Q_A$ . Но они не учитывали того, что освещались хлоропласты, мало адаптированные к темноте (2 мин). Поэтому мы думаем, что концентрация КВС в  $S_2$ - и  $S_3$ -состояниях была выше, чем в  $S_0$  и  $S_1$ , т. е. не все КВС успели вернуться в основное состояние. Влияние адаптации на состояние ферментативного комплекса хорошо подтверждается нашими опытами: с увеличением времени адаптации падает интенсивность А-пика (рис. 3). Следовательно, предположение о том, что А-пик есть результат реакции рекомбинации электронов с  $Q_A$  с положительными дырками с КВС в  $S_4$ -состоянии, лучше объясняет экспериментальные данные. В пользу этого предположения говорит также тот факт, что переход  $S_0$  в  $S_4$  блокируется при  $-10^\circ C$  (см. рис. 1), а это есть точка заморозки раствора в тилакоидном пространстве [4]. Мы предполагаем, что при нагреве до  $-10^\circ C$  нарастает концентрация КВС в  $S_4$ -состоянии и, следовательно, растет интенсивность А-пика. При достижении  $-10^\circ C$  появляется вода в жидком состоянии, которая сразу же соединяется с ферментативным комплексом, и КВС тут же переходит в

$S_0$ -состояние. С этого момента концентрация КВС в  $S_4$ -состоянии уменьшается и интенсивность  $A$ -пика падает. Неэлементарность  $A$ -пика, проявляющаяся в наличии плеча в районе  $+10^\circ\text{C}$ , может быть связана с участием в формировании  $A$ -пика кроме  $S_4$ - других  $S$ -состояний. Возможно также, что наблюдаемое плечо обусловлено фазовым переходом при плавлении межклеточного раствора [11]. Для окончательного ответа на вопросы о природе неэлементарности  $A$ -пика необходимо проведение дополнительных экспериментов.

Большинство исследователей [1—7,12] считают, что за возникновение  $B$ -пика ответственна реакция рекомбинации положительных дырок с КВС в  $S_2$ - и  $S_3$ -состоянии с электронами с хинонового акцептора (см. рис. 1).

При проведении опытов с газовой смесью 1 мы обнаружили три пика ( $A$ ,  $B$  и  $C$ ) с температурами максимумов, как в контрольном опыте. Однако интенсивность  $B$ -пика уменьшилась примерно вдвое по отношению к контрольной (см. рис. 2, 2). Необходимо отметить, что доля кислорода в этой смеси 12,1%, что почти вдвое меньше, чем в атмосферном воздухе (примерно 21% по [13]). Пик  $C$  в этом опыте имел интенсивность также наполовину меньше, чем в контрольном, а  $A$ -пик не менялся.

Добавляя в кристат смесь газов 2 во время нагревания образца, мы обнаружили только  $A$ -пик. На месте  $B$ -пика осталось плато, интенсивность которого упала до нуля при температуре около  $+60^\circ\text{C}$ .  $C$ -пик вообще не наблюдался. Идентичную характерную кривую ТЛ мы зарегистрировали при использовании газов  $\text{He}$ ,  $\text{Ar}$ ,  $\text{Xe}$ ,  $\text{N}_2$  и  $\text{CO}_2$ , а также в опытах, когда в кристате создавали вакуум (см. рис. 2, 3).

Если исходить из предположения, что за  $B$ -пик отвечает реакция рекомбинации положительных дырок КВС в  $S_2$ - и  $S_3$ -состояниях с электронами со вторичного хинонового акцептора  $Q_B^-$  [2], то падение интенсивности  $B$ -пика при уменьшении концентрации  $\text{O}_2$  следует объяснить влиянием изменения содержания  $\text{O}_2$  в окружающей среде на ЦЭТ. Такое влияние действительно обнаружено [7, 14] по изменению баланса между циклическим и линейным транспортом электронов. Контроль над этим балансом осуществляется реакциями псевдоциклического переноса электронов. Однако в темноте циклического, тем более псевдоциклического транспорта нет, а в наших опытах изменяли концентрацию  $\text{O}_2$  уже после облучения. Поэтому факт нулевой интенсивности  $B$ -пика трудно объяснить с точки зрения влияния кислорода на ЦЭТ. Чтобы объяснить наблюдающиеся эффекты, мы предполагаем, что в фотосинтетической единице существует система контроля концентрации  $\text{O}_2$  по принципу отрицательной обратной связи. В бескислородной среде увеличивается скорость выделения  $\text{O}_2$  за счет повышения активности КВС. Но при температуре ниже  $-10^\circ\text{C}$  переход  $S_4$ - в  $S_0$ -состояние заблокирован, поэтому увеличивается концентрация КВС, находящихся в  $S_4$ -состоянии. Следовательно, при увеличении активности КВС интенсивность  $B$ -пика должна падать и излучается только  $A$ -пик, что и наблюдается.

$C$ -пик зависит от концентрации кислорода в окружающей среде очень сильно. С одной стороны, этот пик связывают с перекисными реакциями [3, 8], а с другой стороны, в [12, 14] предполагают, что  $C$ -пик может быть результатом реакции рекомбинации электрона с первичного акцептора фотосистемы 1 с положительными дырками пластохинонового пула. Мы считаем, что форма  $C$ -пика обусловлена обоими упомянутыми выше факторами, и в этом случае гипотезы, высказанные в [3, 8] и [12, 14], непротиворечивы.

Когда в криостат впускали чистый кислород, зарегистрировали три пика: *A*, *B* и *C*. Пики *A* и *B* были такой же интенсивности, как в контрольных опытах, а *C*-пик вырос заметно (см. рис. 2, 4). Видно, что выросла высокотемпературная часть *C*-пика, низкотемпературная часть осталась примерно такой же, как и в контроле. При отсутствии  $O_2$  (см. рис. 2, 3) *C*-пик не имел явно выраженного максимума. Из этого можно сделать предположение, что высокотемпературная часть *C*-пика связана с перекисными реакциями [3, 8], а низкотемпературная — с электронным транспортом [12, 14].

К интересным результатам привели нас опыты без облучения образца после темновой адаптации. Прделав все то, что делали в контрольном опыте, за исключением облучения, мы зарегистрировали пики *B* и *C*. *A*-пик не наблюдался вообще (рис. 4, 1). Подобный эксперимент на хлоропластах не приводил к излучению ТЛ [4]. Когда ЦЭТ ингибировали с помощью диурина (*DCMU*) (3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина, 0,1 мл,  $10^{-5}$  М), который вводили медицинским шприцем с тонкой иглой в жилку листа, мы смогли зарегистрировать на необлученных образцах только *C*-пик, *A*- и *B*-пики не наблюдались (рис. 4, 2). На основании этого можно утверждать, что в листьях наиболее стабильны состояния КВС  $S_2$  и  $S_3$ , в то время как в хлоропластах —  $S_0$  и  $S_1$  [4, 6], что, видимо, связано с процессом выделения хлоропластов.

Когда регистрировали кривую ТЛ листьев бобов, которые обрабатывали *DCMU* и облучали стандартно, обнаружили только два пика: *A* и *C* (рис. 4, 3). Такой же опыт в условиях вакуума дал только *A*-пик (рис. 4, 5). Контрольным опытом в этой серии был опыт с введением в жилку листа  $H_2O$ , растворителя *DCMU* (рис. 4, 4). *DCMU* не только блокирует ЦЭТ, но может влиять и на КВС [15], препятствуя переходу ферментативного комплекса из  $S_4$ - в  $S_0$ -состояние. Это означает, что при возбуждении фотосистемы 2 увеличивается концентрация КВС в состоянии  $S_4$ , и в итоге запасенная световая энергия высвечивается в *A*-пике.

На основании полученных нами экспериментальных данных и известных из литературы фактов можно сделать следующие выводы. Существует непосредственное влияние концентрации кислорода на транспорт электронов в фотосистеме 2, которое, по нашему мнению, осуществляется по механизму отрицательной обратной связи кислорода с КВС. Наиболее стабильным состоянием КВС в адаптированных к темноте (более 8 мин) листьях являются  $S_2$ - и  $S_3$ -состояния. Пик *C* зависит по крайней мере от двух факторов: электронного транспорта и перекисных реакций.

Авторы благодарят А. П. Рязина и А. И. Соколова за помощь в работе.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Черноколев А. Т., Кукушкин А. К., Солнцев М. К. Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон., 1979, 20, № 1, с. 27. [2] Rutherford A. W., Crofts A. R., Inoue Y. Biochem. et Biophys. Acta, 1982, 682, p. 457. [3] Crofts A. R., Wright C. A. Ibid., 1983, 726, p. 149. [4] Inoue Y., Shibata K. Proc. 4th. Int. Cong. on Photosynthesis, 1977, p. 211. [5] Inoue Y., Shibata K. Trends Biochem. Sci., 1979, 8, N 4, p. 297. [6] Ichikawa T., Inoue Y., Shibata K. Biochem. et Biophys. Acta, 1975, 408, p. 228. [7] Arnon D., Chain R. FEBS Lett., 1977, 82, N 2, p. 297. [8] Красновский А. А. (мл.), Литвин Ф. Ф. Молек. биол., 1969, 3, № 2, с. 282. [9] Шварц К. К., Грант Э. А., Мегис Т. К., Груббе М. М. Термолуминесцентная дозиметрия. Рига, 1968. [10] Pliquet F., Solnzev M. K. Thermolumineszenz biologischer objekte. Leipzig, «Georg Thieme» VEB, 1978. [11] Vass I., Horvath G., Herczeg T., Demeter S. Biochem. et Biophys. Acta, 1981, 634, p. 140. [12] DeVault D., Govindjee, Arnold W. Proc. Nat.

АСТРОНОМИЯ

УДК 528.21/22

**О НЕКОТОРЫХ ВОЗМОЖНОСТЯХ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛА  
ПРЯЖЕНИЯ ПРОИЗВОЛЬНОГО ТЕЛА РЯДОМ, СХОДЯЩИМСЯ  
ВСЮДУ ВНЕ ЕГО ПОВЕРХНОСТИ**

Н. А. Чуйкова

(ГАИШ)

При обработке спутниковых и наземных гравиметрических данных обычно встает вопрос о возможности применимости единого ряда Лапласа для представления потенциала и его производных, ибо сходимость этого ряда всюду вне поверхности планеты доказана лишь для некоторого класса поверхностей [1]. Для произвольного вида поверхности тела эту задачу позволяет решить теорема Рунге — Краупа, утверждающая, что любую гармоническую вне поверхности  $\sigma$  функцию  $\varphi \in H_\sigma$  можно равномерно приблизить с помощью последовательности функций  $\psi_j \in H_\sigma$ , гармонических вне произвольной внутренней к  $\sigma$  сферы, или же с помощью частных сумм рядов Лапласа для  $\{\psi_j\}$  [2]:

$$\varphi = \lim_{j \rightarrow \infty} \psi_j = \lim_{j \rightarrow \infty} S_{n_j} = \lim_{j \rightarrow \infty} \sum_{k=0}^{n_j} A_k^{(j)} Y_k, \quad (1)$$

где  $Y_k$  — шаровая функция. Однако в этом случае встает вопрос о единственности такого представления и о том, насколько отличаются между собой коэффициенты  $A_k^{(j)}$  каждого последующего приближения (т. е. вопрос о непрерывности функционала  $A_k^{(j)}(\varphi)$  в пространствах  $H_\sigma$ ,  $H_\varphi$ ,  $H_s$ ).

Система шаровых функций  $\{Y_k\}$  в пространстве  $H_\sigma$  представляет собой базис в широком смысле (полная усиленно линейно независимая (у. л. н.) система функций, биоортогональная которой система линейных функционалов  $\{A_k\}$  обладает свойством единственности). Ее полнота (совпадение замкнутой линейной оболочки  $\{Y_k\}$  с  $H_\sigma$ ) следует из теоремы Рунге — Краупа, у. л. н.

$$\left( \lim_{j \rightarrow \infty} \sum_{k=0}^{n_j} A_k^{(j)} Y_k = 0 \Rightarrow \lim_{j \rightarrow \infty} A_k^{(j)} = 0 \right)$$

обусловлена наличием биоортогональной ей системы линейных функционалов  $\{A_k$  — стоксовы постоянные}, обладающей свойством единственности ( $A_k(\varphi) = 0 \Rightarrow \varphi = 0$ ) в силу теоремы единственности. Из условия у. л. н.  $\{Y_k\}$  следует, что существуют пределы  $\lim_{j \rightarrow \infty} A_k^{(j)} = A_k(\varphi)$  — непрерывные в  $H_\sigma$  функционалы, не зависящие от выбора  $\{\psi_j\}$ ,  $\{S_{n_j}\}$  [3, с. 577; 4, с. 135].

Поскольку  $\{Y_k\}$  — базис в широком смысле, то каждому  $\varphi$  можно