

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

ІНСТИТУТ БОТАНІКИ ім. М.Г. ХОЛІДНОГО

на правах рукопису

УДК 576.11:577.355

СИВАШ Олександр Олексійович

ТЕТРАПІРОЛЬНІ СПОЛУКИ В НАДМОЛЕКУЛЯРНИХ
ГЕТЕРОГЕННИХ СТРУКТУРАХ: ДЕЯКІ АСПЕКТИ
ЕВОЛЮЦІЇ ФОТОСИНТЕЗУ

03-00-02 - біофізика

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1994



00778642 (Y)

Дисертація

Робота виконувалась в Інституті біохімії ім. М. Г. Довгалецького АН України, та відділі фотохімії Інституту фізики ім. В. І. Степанова АН Білорусі

Наукові керівники : доктор біологічних наук,
професор Судьбіна О. Г.,

кандидат біологічних наук
Лосва Г. І.

Офіційні опоненти : член-кореспондент АН України
професор Ясніков О. О.

кандидат біологічних наук
Самохвал Б. Г.

Провідна організація: Київський університет ім. Т. Г. Шевченка
Біологічний факультет

Захист відбудеться 8 "серпня" 1994 в 14 год
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 173.01.01 в
Міжгалузевому науково-інженерному центрі в фізиці живого та мік-
рохвильової резонансної терапії " ВІДГУК " при Кабінеті Мініст-
рів України за адресою: 252033, м. Київ, вул. Володимирська 616

В дисертацію можна ознайомитись в бібліотеці МНЦ

Автореферат розісланий 7 "жовтня" 1994 р.

Вчений секретар
спеціалізованої ради
доктор фіз-мат. наук

Литвинів Г. С.

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

Актуальність теми. Дослідження функціонування і еволюції фотоенергетичних процесів за участю тетрапірольних макромолекул актуально для розвитку фотобіології і нових напрямків науки, техніки (молекулярна електроніка, створення фототрансформаторів сонячної енергії, біосенсорів). Первинні стадії захвату і утилізації сонячної радіації, залежать від властивостей пігментів, а стан пігментів в різних системах, зокрема характер пігмент-пігментних взаємодій, надмолекулярна структура нативних комплексів визначають закономірності первинних фотопроцесів. Значні успіхи в дослідженні цих процесів за участю фотосинтетичних пігментів отримані при вивченні модельних систем різного типу: пігмент-білкові комплекси, міцели, ліпосоми. Такі системи являють собою структурно-організоване середовище, що має ряд властивостей притаманних нативним мембранам. Вивчення енергетики і динаміки штучних надмолекулярних систем з участю тетрапірольних сполук, є необхідним етапом в пізнанні закономірностей функціонування нативних комплексів, а також еволюційних аспектів формування фотокаталітичних систем.

Метою роботи було вивчення спектральних і енергетичних властивостей ряду тетрапірольних пігментів як можливих первинних фотосенсибілізаторів в умовах зв'язку з гетерогенним носієм, а також закономірності передачі збудження між ними в надмолекулярних гетерогенних структурах. В зв'язку з цим в заданій дисертаційній роботі входило:

1. Вивчення спектральних і фотохімічних властивостей ряду тетрапірольних пігментів в надмолекулярних гетерогенних структурах (міцели детергентів, пігмент-білкові комплекси).

2. Вивчення спектрально-люмінесцентних властивостей хлорофілу і його аналогів в міцелах різних детергентів при варіюванні умов включення.

3. Вивчення закономірностей передачі енергії електронного збудження між хлорофільними пігментами в гетерогенних надмолекулярних структурах і локалізації пігментів в таких системах.

Наукова новизна. Встановлена залежність фотохімічної активності ряду тетрапірольних сполук від умов оточення, а також спектральні і енергетичні властивості D_0 і I_0 в комплексах з тер-

маленьким протеїноїдом і ПАР. Отримані систематичні характеристики спектральних і енергетичних параметрів хлорофілу і його аналогів в міцелях різних ПАР при варіації параметрів гетерогенного носія та числа посадки пігменту на міцелі. Отримано параметри передачі енергії електронного збудження для різних донорно-акцепторних пар (Хл--Хл, Пхл--Хл, Р68--Фео) в міцелях ПАР і на основі цих даних сформульована просторова локалізація пігментів в міцелях.

Практичне значення роботи. Отримані спектральні та енергетичні параметри фотосинтетичних пігментів в міцелях ПАР можуть бути корисними для дослідників, що використовують детергенти для дезінтеграції нагнаних структур. Розроблений метод для визначення локалізації пігментів в сферичних частинках на основі даних індуктивно-резонансної передачі енергії.

Анотація роботи. Основні результати доповідались на наступних конференціях: IV Український біохімічний з'їзд / Дніпропетровськ, 1982 /, Всесоюзній конференції по еволюційній біохімії і походженню життя /Петровзаводськ, 1984 /, IVth International Meeting on Evolutionary Biology IIIrd Symposium on Evolutionary Morphology / Plzen, 1984/, V Український біохімічний з'їзд /Івано-Франківськ, 1987 /, International Symposium "Towards a New Synthesis in Evolutionary Biology" / Praha 1987 /, The 6th ISSOL Meeting and the 9th International Conference "THE ORIGIN OF LIFE" / Prague, 1988 /.

Прийняті скорочення. Хл-хлорофіл, Пхл-протохлорофіл, Пх IX-протохлорофірин IX, Фео-феофітин, R_c-критична відстань передачі енергії, В-максимум вихід флуоресценції, TX-100-трилон X-100, ЦТАБ-цетилтриметиламоній бромід, ДОН-додецилсульфат натрію; Z-середнє число молекул пігмента, що припадає на міцелу.

У вступі показана актуальність теми, сформульована мета і задані досліджень.

Глава 1 присвячена огляду літератури по фотопроцесах в хімічній і добіологічній еволюції. Наступні розділи присвячені огляду літератури по фотоніці молекул Хл а, Фео а. Розглянуті характер і умови агрегації пігментів в різних розчинниках, а також бінарних сумішах розчинників. Подано короткий огляд робіт по індуктивно-резонансній передачі енергії між різними пігментами в нативних і модельних системах.

Глава 2 в методично. В цій главі описані методи отримання та ідентифікації пігментів, спектральна апаратура, наведені по-

хиски вимірювань, а також міститься необхідна інформація по розрахунках передачі енергії і умовях проведення фотохімічних реакцій.

В главі 3 наведені дані фотохімічних і спектрально-люміноцентних властивостей пігмент-протеїноїдних і пігмент-білкових комплексів. Дослідження фотохімічної активності / відновлення метилового червоного на світлі в присутності аскорбінової кислоти / тетрапірольних сполук показує (табл. 1), що в водному оточенні і в комплексах з протеїноїдом і САЛ фотосенсибілізаційна активність зростає від більш далеких до більш близьких попередників Хл /уропорфірин-протопорфірин-хлорофілід /.

Таблиця 1
Фотохімічна активність тетрапірольних сполук в залежності від умов оточення /умовні одиниці /

Пігмент	буфер	протеїноїд	САЛ
1 Уропорфірин	7,1 ⁺ - 1,8	6,2 ⁺ - 1,2	7,4 ⁺ - 1,28
2 Копропорфірин III	6,8 ⁺ - 0,68	-	9,2 ⁺ - 1,04
3 Протопорфірин IX	19,3 ⁺ - 3,6	21,7 ⁺ - 1,7	-
4 Хлорофілід а	36,4 ⁺ - 1,4	51,9 ⁺ - 1,47	51,8 ⁺ - 1,47
5 Феофітин а	6,8 ⁺ - 1,0	122,6 ⁺ - 6,7	146,9 ⁺ - 3,1
6 Хлорофіл а	8,1 ⁺ - 1,2	270,6 ⁺ - 9,9	273,2 ⁺ - 12,1
7 Темін	0,0	0,0	0,0
8 Тетрафенілпорфін	0,0	1,2 ⁺ - 1,7	6,2 ⁺ - 0,78

Однак у порфіринів, що мають фітол ІХ агрегація в воді приводить до сильного зниження фотохімічної активності. Використання як носіїв білку або протеїноїду чітко відрізняє сенсифікаційні властивості цих пігментів. Отримані дані вказують на залежність структурних перетворень молекул пігменту з еволюційній просунутості фотохімічних властивостей, а також дезагрегуючу "організуючу" роль носія.

Особливу увагу було приділено Пп ІХ-ключовій сполучі біосинтетичного шляху Хл і тему. В спектрі поглинання Пп ІХ в буфері, а також з САЛ і протеїноїдом відбуваються суттєві зміни особливо в Q-смузі /рис. 1 /. Центри, що здатні випромінювати і спостерігаються в спектрі збудження флуоресценції не ідентичні спектрам поглинання /рис.2, табл. 2 /. Великий голубий суув цен-

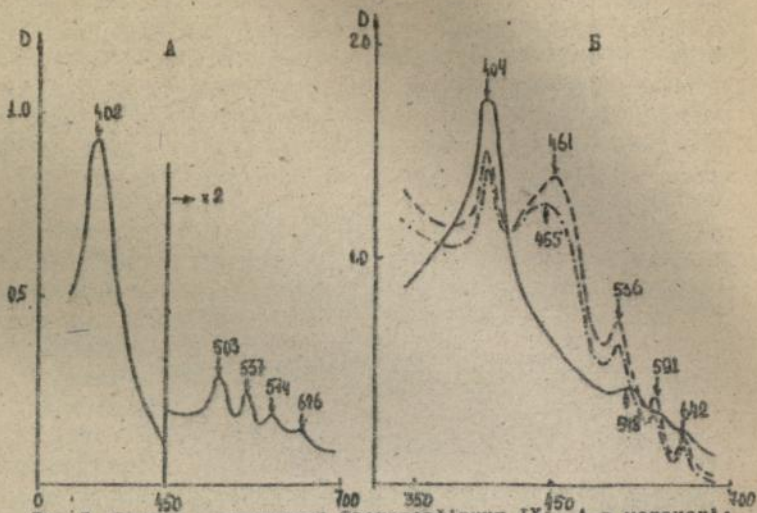


Рис.1 Спектр поглинання протопорфірину ІХ: А-в метанолі; Б-в фосфатному буфері: --- без носія, --- з САІ, - - - з протіноїдом

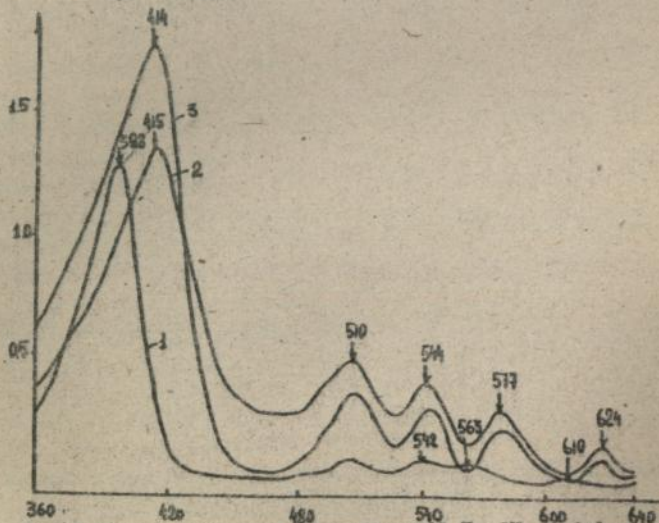


Рис.2 Спектр збудження флуоресценції Пп ІХ в буфері: 1-без носія $\lambda_{\text{ввст.}}$ 620 нм /, 2- з протіноїдом $\lambda_{\text{ввст.}}$ 630 нм /, 3- з САІ $\lambda_{\text{ввст.}}$ 630 нм /

трів флуоресценції в буфері / 400 см⁻¹/ по відношенню до мономерів не може належати димерам. Це підтверджується моноекспоненціальним розпадом цих центрів з часом життя 15-16 нс /табл. 2/. Висловлено припущення, що центрами флуоресценції Пп ІХ в буфері є мономерні зв'язані з міцелоподібними агрегатами.

При вимкненні Пп ІХ в міцели ЦТАВ і ТХ-100 спостерігається практично повна дезагрегація пігменту. У відомо заряджених міцелах ДСН тільки часткова, очевидно, тому, що пропіонові залишки несуть також відємний заряд.

Таблиця 2

Спектрально-люмінесцентні характеристики Пп ІХ
в умовах різнго оточення

Умови	$\lambda_{\text{фл}}$ нм	Φ	τ нс
Метанол	633	0,155	17,5
Буфер 0,05 М рН 7,0	618-620	0,009	15,52
Буфер, протеїноід	632	0,020	-
Буфер, САЛ	633	0,041	-
ЦТАВ	633	0,145	16,01
ЦТАВ, КВг	633	0,135	-
ТХ-100	633	0,109	-
ДСН	632	0,008	-
ДСН, NaCl	632	0,028	-

Передача енергії між молекулами Пп ІХ лімітується низьким поглинанням в довгохвильовій частині спектру. Критична відстань передачі енергії $R_0 \approx 27 \text{ \AA}$, а ймовірність передачі $F \approx 2,1 \cdot 10^9 \text{ с}^{-1}$, при відстанях між молекулами 12 \AA , що на два порядки менше ніж для хлорофілу. Однак Q-смуга Пп ІХ знаходиться в області спектру де інтенсивність сонячної радіації вища ніж для Q-смуги Хл. Тому не дивлячись на те, що переріз поглинання Q-смуги Хл $3,6 \cdot 10^{-16} \text{ см}^2$, а Пп ІХ $1,6 \cdot 10^{-16} \text{ см}^2$, захват енергії сонячного випромінювання Пп ІХ відбувається не менш ефективно ніж в випадку Хл, хоча і не впливає на R_0 . Це труднощі можна обійти використовувачи велику кількість реакційних центрів без янтра /Olson 1967/. На нашу думку функцію янтра могли виконувати термальні протеїноїди, пігментовані меланоїдинами, гетерогенними пігментами з неспецифі-

чим поглинанням в УФ і видимій частинах спектру. Меланоїдіни мають інтенсивну флуоресценцію, що добре перекривається зі спектром поглинання Пп IX, і створює умови для індуктивно-резонансної передачі енергії. Комплексоутворення Пп IX з протеїноїдом збільшує перерів поглинання випромінювання за рахунок дезагрегації пігменту. Пігментовані протеїноїди мають сигнал ЕПР в ДН-8 Го і $g=2,003$, що свідчить про те, що сигнал належить делокалізованим електронам. Освітлення протеїноїдів УФ і видимим світлом при низьких температурах викликає збільшення інтенсивності сигналу ЕПР. Меланоїдіни являють собою високоспрямлені полімери, при дії світла в яких можуть проходити зворотні процеси переносу електрона, що призводять до утворення аніон- і катіон-радикальних центрів і ефективно виконувати фотокаталітичну функцію.

Можна сказати, що отримані результати підтверджують класичну гіпотезу, що життя виникло в розчині і розвивалося в організованих системах; починаючи від сильно зарядженого уропорфірину, заряджені групи еліминувалися і закінчуючи хіліподібним хлорофілом.

В кінці відмічається повільне просування в розумінні ролі магнію і циклопентанового кільця для функціонування фотосинтетичних пігментів. Висловлена думка, що роль металу може бути пов'язана з формуванням динамічних властивостей ЦЗК, головним чином в підстройці антени для передачі енергії на реакційні центри, особливо в умовах варіації спектральних характеристик вольного джерела випромінювання.

Глава 4 присвячена дослідженню сольбілізації Хл і його аналогів в мицелах ПАР. Сольбілізація пігментів мицелами ПАР викликає дезагрегацію Хл і його аналогів, особливо чітко це виявляється коли на мицелу припадає не більше 2-3 молекул пігменту. При Z-1-2 спектрально-лімінесцентні параметри Хл і Пп практично відповідають мономерному стану, а багаторомний асуд спектрів по відношенню до ацетонівих розчинів пігменту обумовлений амінами фізико-хімічних властивостей мікрооточення хромофорів /табл. 3/. В заряджених мицелах падіння величини В і τ вказує на гетерогенний характер сольбілізації пігментів. Наявність поляризованої флуоресценції пігментів є доказом вилучення пігментів в мицели і свідчить про достатньо коротку фіксацію хромофорів. Час кореляції ізоотропного обертання мицели $0,5 \cdot 10^{-6}$ с, що не дає помітного вкладу в деполаризацію флуоресценції. В мицелах нейтрального IX-100 спект-

Таблиця 3. Спектрально-люмінесцентні параметри Хл і Пхл в міцелях різних ЦАР при $Z = 1-2$ $T = 293$ °K

Штуківка	Умови солюбілізації:	Поглинання			Флуоресценція					τ_T с
		$\lambda_{\text{H}}^{\text{Core}}$ нм	$\lambda_{\text{H}}^{\text{ZP}}$ нм	$\epsilon_{\text{M}}^{\text{ZP}}$ $\text{M}^{-1}\text{CM}^{-1}$	λ_{00} нм	λ_{01} нм	B	τ_s нс	P, % $\lambda = 405\text{нм}$	
Мікрофілія	ТХ-100, H ₂ O	436	669	62000	675	728	0,29	5,8	12	$4,9 \cdot 10^{-6}$
	ТХ-100, буфер; 0,5 M NaCl	436	670	56000	676	730	0,21	5,6	12	$3,6 \cdot 10^{-6}$
	ДСН, буфер; 0,5 M NaCl	437	670	46000	679	735	0,14	4,7	10	$1,8 \cdot 10^{-6}$
	ЦТАБ, буфер; 0,02 M KBr	438	669	54000	679	736	0,19	5,1	9	$1,9 \cdot 10^{-6}$
Мікрогелорфілія	ТХ-100, H ₂ O	438	630	26000	633	693	0,13	5,9	13	-
	ТХ-100, буфер; 0,5 M NaCl	440	631	18000	635	694	0,10	4,9	11	-
	ДСН, буфер; 0,5 M NaCl	443	634	16000	638	695	0,03	4,6	13,5	-
	ЦТАБ, буфер; 0,02 M KBr	440	632	19500	639	695	0,04	4,0	13	-

ральні параметри X_L і P_{X_L} не змінні впродовж кількох діб. У випадку аніонного ДСН відбувається фосфитізація пігменту, обусловлена наявністю ПШВ в високій концентрації протиіонів. Використання буферних розчинів зводять цей процес до мінімуму. Однак додавання буферу і електролітів до мицелярних розчинів ТХ-100 призводить до проявлення агрегаційних взаємодій, змінюється спектр поглинання і флуоресценції, зменшуються квантові виходи, кінетика затухання флуоресценції стає неекспоненціальною. Навіть при Z=1-2 додавання солей до ТХ-100 дає змінює величини B і τ , що обусловлено порушенням гомогенності видочення X_L і P_{X_L} в мицелі. При збільшенні Z для всіх ПАР спостерігається зміна електронних спектрів пігментів і зменшення квантових виходів флуоресценції розчинів /рис. 3/ Крім того, для X_L в ТХ-100 при

$Z > 15$, а ЦТАБ при $Z > 8$ не вдається зареєструвати сигнал Т-Т поглинання при лазерному збудженні. В розсах Z в кінетичі затухання флуоресценції X_L і P_{X_L} зростає відсоток короткоживучої компоненти. Однак, в спектрах ЦД X_L в мицелах вивчених ПАР не проявляється розщеплення в області червоного смуг поглинання, як це має місце для впорядкованих агрегатів X_L і P_{X_L} в бінарних сумішах розчинників зі значним перекриванням мафодіцилів. Деагрегуєчка для мицел зменшує пігмент-пігментні взаємодії і приводить до формування слабкоз'язаних "рихлих" агрегатів. При збільшенні Z до 8 в спектрах поглинання P_{X_L} в мицелах ДСН помітна поява нового поглинання в області смуги $Sope$ і основного максимуму.

Одночасно в спектрах ЦД спостерігаються компоненти розщеплення

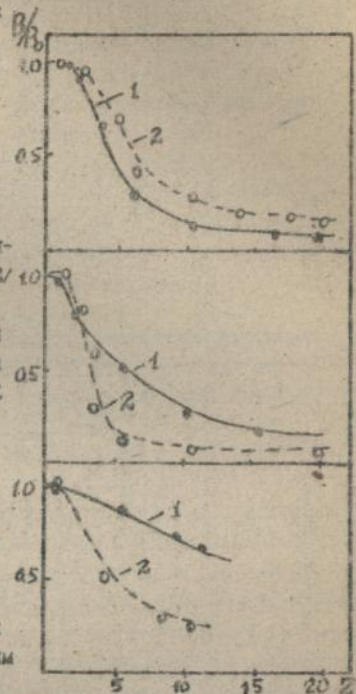


Рис. 3. Залежність відносного квантового виходу флуоресценції X_L /1/ і P_{X_L} /2/ від числа посадки Z в мицелах ТХ-100 /а/, ДСН /б/, ЦТАБ /в/.

протилежних знаків при 422 нм і 480 нм, характерного для зпору-
дкованих агрегатів Пхл. Відмітки, що агрегати Пхл в
довгохвильовим максимумом поглинання при 670 нм і флуорисценції
680 нм в звичайних розчинах і бінарних сумішах отримать не
вдається. По аменшшенню стабільності пігментів і дезагрегуючій
здатності досліджені детергенти розташовуються в такій
послідовності ТХ-100, ЦТАБ, ДСН.

Поведінка Фео в розчинах ПАР відрізняється від Хл і Пхл. В
водних розчинах, чи бінарних сумішах, одним з компонентів котрих
є вода, Фео утворює агрегати з довгохвильовою смугою поглинання
693-695 нм, а високою оптичною активністю. Слабка флуорисценція
мономерів в цих умовах пов'язана з тим, що в воді рівновага моно-
мер/агрегат зсунута в бік утворення агрегатів. Додавання NaCl в
розчин приводить до деформації електронних спектрів, котра мало
змінюється в часі. Молекули солі проникають в сольватну оболонку
агрегату, що викликає bathochromний зсув спектру. Потім додатні
іони встраюються в центр димерної комірки асоціату без суттєвої
зміни його структури, оскільки спектри ПД і основні спектральні
параметри системи згадуються типовими для агрегованого Фео.
Виключення Фео в міцелі ПАР показує, що пігмент в значній мірі аг-
регований у відсутності сольових добавок: ТХ-100 при $Z > 5$, ДСН $Z >$
 2 , ЦТАБ $Z > 5$. Додавання NaCl у всіх випадках приводить до спек-
тральних змін, що свідчать про дезагрегацію пігменту, більш яскра-
во виражену в іонних ПАР. Так в міцелах ДСН при $Z=12$ Фео повністю
агрегований, додавання NaCl /0,5 М / викликає дезагрегацію піг-
менту, що повністю завершується через 20-24 год і характеризу-
ється наявністю ізобестичних пунктів в спектрах поглинання. По-
дібна картина спостерігається в міцелах ЦТАБ, однак, при концен-
трації КЕг на порядок меншій. В цих умовах в міцелах ЦТАБ і ДСН
моно- і дикаціонаи не утворюються. В таблиці 4 приведені основні
параметри Фео при досягненні рівноважної сольватизації в міцелах
ПАР в присутності солі. При збільшенні Z агрегація Фео проявля-
ється найперше в міцелах ТХ-100. Специфічність поведінки Фео по
відношенню до Хл в міцелах ПАР в присутності електроліту обумов-
лена тим, що міцелі ТХ-100 сильно оводнені в порівнянні з ДСН і
ЦТАБ і вода проникає впритул до феноксидної групи. При цьому в
міцелах ТХ-100 з відповідним Z Фео агрегований сильніше ніж Хл.
Додавання NaCl /0,5 М / приводить до зниження активності води а це
в свою чергу викликає збільшення розмірів міцел і зменшення по-

лярності гідрофільного шару і сприяє дезагрегації Фео. Агрегація Хл відбувається за участю центрального іона Mg, а вплив протіонів ПЕШ в більшій мірі зумовлює сольватокромні ефекти і не збільшує дезагрегуючої дії міцел ДСН і ЦТАВ в порівнянні з ТХ-100. Агрегація Фео має інший характер, в центр елементарної комірки асоціату можуть встроюватися іони, і крім того, асоціати Фео характеризуються від'ємним поверхневим зарядом, тому електростатичне поле ПЕШ, а також велика концентрація протіонів можуть впливати на заряд асоціату і сприяти дезагрегації макроциклів.

Таблиця 4
Спектрально-люмінесцентні параметри Фео в міцелях ПАР в присутності індиферентного електроліту.

Умови сольватизації	Z	Поглинання			Флуоресценція		
		λ_m нм	λ_m нм	ϵ л·м ⁻¹ ·с ^м ⁻¹	λ_m нм	B	τ нс
ТХ-100, тряс-НСІ буфер 0,01M рН 9,1	10	414	895	$4,8 \cdot 10^4$	704	0,01	1,0
	2	412	873	$4,9 \cdot 10^4$	878	0,20	5,7
ЦТАВ, фосф, буфер 0,01M рН 8,65 0,02M KBr	10	406	872	$4,2 \cdot 10^4$	878	0,19	5,6
	2	406	872	$4,9 \cdot 10^4$	878	0,23	5,7
ДСН, тряс-НСІ буфер, 0,01M рН 9,1, 0,5M NaCl	10	414	873	$4,9 \cdot 10^4$	681	0,24	6,1
	2	414	873	$5,0 \cdot 10^4$	680	0,25	6,2

Специфіка будови і фізичних характеристик міцел приводить до негомогенних ефектів в спектрах поглинання пігментів. Відомо, що міцели ДСН і ЦТАВ при низькій іонній силі мають потенціал поверхні 0,5 В, а при 0,1 М NaCl-0,15 В. При товщині іонної атмосфери в кілька десятків А, напруженість поля може досягати 10^4-10^6 В/см. Такі поля здатні викликати електрохромні ефекти в електронних спектрах. Фізичні параметри при просуванні в мицелярну фазу суттєво змінюються. Перехід від водної до мицелярної фази приводить до зміни діелектричної постійної від 80 до

10. Для міцел ДСН при концентрації ПАВ рівній КЗМ концентрація протіонів в шарі Штерна досягає 3,5-4,5 М. Поверхня міцели вдатна до флуктуацій внаслідок варіацій поверхневого натягу, ефект Марангоні, а також термічних флуктуацій. Виходячи з термодинаміки можна оцінити масштаб термічних флуктуацій міцели $(\Delta R - ((V-\bar{V})^2/S))^{1/2}$, де S площа флуктуючого елемента. Для сферичної міцели TX-100 $\Delta R - 1,1 \cdot 10^{-1} - 1,5 \cdot 10^{-1}$ А, ці оцінки відносяться тільки до повносиметричних флуктуацій. Якщо розмір флуктуючого сегмента складає 30-40 А / площа, що припадає на молекулу TX-100/ то $\Delta R - 1-3$ А, а для міцел ДСН і ЦТАБ більше, то хромофори будуть знаходитись в різному реактивному полі. Оцінка енергії екзотонних взаємодій двох молекул Х₁ в міцелі при R-2 нм $V - 5,04 \cdot 10^{-2} \text{к}^2/\text{R}^3 \text{н}$ дає для випадку паралельних диполів, во лежать вадомж одній лінії $V - 12 \text{ см}^{-1}$. Таким чином всі ці ефекти можуть викликати неоднорідне розширення смуг поглинання.

При імпульсному збудженні Х₁ в міцелак TX-100, спостерігається наведене поглинання з часом життя 4-6 10^{-4} с і на 2-3 порядки коротше в присутності кисню /табл 3 /. Бімолекулярна константа швидкості дезактивації Т-збуджених молекул Х₁ киснем: 7,2 $10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ для TX-100, 1,8 $10^9 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ для ДСН, 2,1 $10^9 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ для ЦТАБ. Якщо врахувати розподілення кисню між фазами, то константи будуть меншими: 0,9 $10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, 3 $10^8 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, 4 $10^8 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ для TX-100, ДСН і ЦТАБ відповідно. Той же порядок величини мають константи тушіння трилетів Zn-порфірингемінеого міоглобіну киснем 9,6 $10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ і антрахіносульфонатом 2,1 $10^8 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ /Barbov et al. 1987 /. Будова і динамічні властивості міцел забезпечують високу швидкість проникнення і рухливості кисню, що сприяє його взаємодії зі збудженими хромофорами. Для білків також характерна висока швидкість проникнення кисню і ряду інших молекул всередину глобули. Конформаційні рухи в білку або міцелі можуть відбуватись вже при наявності у відповідному місці флуктуаційної порожнини "дірки". "Дірки" всередині глобули або міцели утворюються за рахунок власного вільного об'єму або дифузії його із розчинника. У випадку міцел грають роль два цри процеси забезпечуючи дифузії молекул всередину таких утворень, причому другий спосіб проникнення визначає залежність ефективності проникнення речовин від в'язкості розчинника. В наближенні армованої краплі, міцели можуть бути зручними моделями білків.

Дезактивацію Т-станів Х₁ вивчали використовувачи п-бензохінон

/Пбх/ як акцептор електрона. Форма кривих релаксації оптичної густини X_1 в міцелях TX-100, залежить від концентрації тушителя. Введення в систему Пбх в концентрації $7 \cdot 10^{-6}$ М приводить до скорочення часу життя T-станів молекул пігменту. При концентрації Пбх $1,5 \cdot 10^{-5}$ М спостерігаються двокомпонентні криві релаксації оптичної густини. Швидка, відповідає зникненню T-станів молекул X_1 , повільна - радикальних продуктів, оскільки час життя другої компоненти $1,3 \cdot 10^{-3}$ с. Час життя катіон-радикалу X_1 в етанолі $5 \cdot 10^{-2}$ с. Із залежності часу життя T-станів X_1 а від концентрації Пбх в системі були знайдені константи швидкості дезактивації пігменту, $K^T_{\alpha} = 8,4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, що менше ніж в етанолі $K^T_{\alpha} = 3,6 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ і толуолі $K^T_{\alpha} = 2,1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ і дещо більше ніж відомо в літературі для ліпосом $K^T_{\alpha} = 7,2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Подальше підвищення концентрації Пбх приводить до зникнення першої швидкої компоненти затухання наведеної оптичної густини і зменшення другої. Константа швидкості дифузійно-контрольованої реакції в цих умовах $2,4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. При збільшенні аналітичної концентрації тушителя і врахуванні асиметрії розподілення Пбх на користь міцелярної фази зростає число результативних зустрічей не тільки для T, але й для S-збудженого стану X_1 . Однак дисоціація сольватно розділених пар $^3[\text{X}_1 \dots \text{A}]$, $^1[\text{X}_1 \dots \text{A}]$ стабілізованих коловійською взаємодією, на сольватно розділені іон-радикали і молекули у вихідному стані проходить з рівною імовірністю в зв'язку з заборонкою по мультиплетності. Хоча утворення іон-радикалів через триплетний експліко буде домінуючим, однак при великих концентраціях тушителя неможливо враховувати каналу, що йде через синглетний експліко. Таким чином, зникнення на кривих затухання поглинання, що належить T-стану X_1 при великих концентраціях тушителя пояснюється високою швидкістю утворення триплетної іон-радикальної пари. В той же час в міцелярній фазі час контакту продуктів переносу електрона, більший ніж в малов'язкому розчині, тому в міцелях швидкість рекомбінації іон-радикальних пар також вища ніж рекомбінація в малов'язких системах (гемінальна рекомбінація). Введення САЛ в сольватизований TX-100 X_1 приводить до збільшення часу життя T-збуджених молекул $\tau = 7,2 \cdot 10^{-4}$ с. При цьому суттєво зменшується швидкість дезактивації T-станів X_1 Пбх, $K^T_{\alpha} = 2,4 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Утворення катіонрадикалів X_1 не спостерігалось у всій дослідженій області концентрацій від $7 \cdot 10^{-6}$ М до $4 \cdot 10^{-4}$ М. Зменшення швидкості дезактивації T-станів X_1 в системах пігмент-білок-детергент

пов'язано з виникненням стержневих перешкод. Тушіння флуоресценції X_1 п-беназоксіном в міцелах підлягає рівнянню Штерна-Фольмера з $K^T_{\text{ср}} = 2,1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$, наддифузійна область. Введення в систему САЛ приводить до зниження швидкості тушіння флуоресценції в 2 рази. Відмітим той загальний факт, що швидкості тушіння T-станів на 1-2 порядки менші ніж S-станів, і не має задовільного пояснення. У випадку тушіння збуджених станів киснем комбінації статистичного і Франк-Кондонівського факторів приводить до того, що $K^T_{\text{ср}} = (1/9)K^S_{\text{ср}}$. Безрадіаційне тушіння збуджених станів молекули може проходити за рахунок диполь-дипольної передачі енергії, електронного обміну або переносу електрону. При електронному переносі, а також обмінній взаємодії константа швидкості процесу експоненціально зменшується з відстанню $K_{\text{ср}} = K_0 \exp[-(R-R_0)/L]$, де K_0 константа тушіння при відстані ван-дер-Ваальсового контакту і має величину $2 \cdot 10^{12} \text{ с}^{-1}$. Тому не дивлячись на сильну залежність електронного обміну і переносу від відстані отримана константа швидкості може включати електронний перенос на велику відстань. Треба відмітити, що середовище в реакціях електронного переносу за участю збуджених станів виступає як медіатор електронного переносу /Капінуо 1988/. У випадку гетерогенних систем результатів значно менше. Відмітим те, що при тушінні синглетів використовують великі концентрації тушителя, а враховуючи розподілення між фазами, статистику посадки і розподілення відстаней між молекулами в міцелах, то в системі може бути порушена умова наближення повільної дифузії.

В главі 5 викладені результати дослідження передачі енергії електронного збудження між пігментами в міцелах ПАР. Збільшення доказної концентрації пігментів при сольбілізації міцелами ПАР приводить до посилення енергетичної взаємодії між сусідніми випромінюючими центрами в міцелі. Сумісна сольбілізація Пхл /Д/ і Хл /А/ однією міцелою призводить до того, що в спектрах збудження флуоресценції А проявляються смуги поглинання Д. На те, що взаємодія між Пхл і Хл відбувається при збудженні першого, внаслідок скорочення часу життя Пхл в присутності Хл. В міцелах TX-100 в присутності Хл при 2-10 $\tau_{\text{ср}} = 4,3 \text{ нс}$, тоді як для самого Пхл в аналогічних умовах $\tau_{\text{ср}} = 5,0 \text{ нс}$. В міцелах ПАР при рівних числах посадки величини $\Phi^{\text{ТМВ}}$ і $\Phi^{\text{СОН}}$ виявляються досить близькими між собою, що свідчить про те, що міграція енергії від Пхл на агрегати є слабкоконкуруючим процесом. Разом з тим з даних наведених в

табл. 5. витікає, що найменша ефективність передачі енергії реалізується в міцелях ДСН. Це пов'язано з тим, що саме для цього типу міцел характерна значна агрегація пігментів. З даних по ефективності передачі енергії можна розрахувати середні відстані між хромофорами /табл 5 /. З ростом Z на одній міцелі R_0 зменшується і виявляється найменшим для міцел ДСН. Треба відмітити, що в своїх обчисленнях R_0 ми використовували значення орієнтаційного фактору для жорсткої частинної орієнтації. Однак на основі відомого факту про орієнтацію X_2 в ліпосомах / будова бівару ліпосоми і міцели подібні / і врахувавши геометрію системи було обчислено $K=0,9$, що дає помилку в визначенні R_0 по відношенню до частинної орієнтації диполя $6X$. Значення параметрів передачі енергії зазначених в табл. 5, є пересіченими, що визначаються як розподілом молекул по міцелях так і розподілом відстаней між пігментами в міцелі. В зв'язку з цим є можливість обґрунтування загальної картини соціалізації пігментів в міцелях ПАВ. Відомо, що розподіл пігментів по окремих міцелях є пуассонівським $P(n) = \{Z^n / n!\} \exp(-Z)$. З цієї залежності випливає, що найбільший внесок в вимірювані флуоресцентні характеристики дають ті величини посадки, що не дуже відрізняються від Z . Для порівняння відстаней, отриманих з даних по передачі енергії, були визначені середні відстані між молекулами в міцелі виходячи з геометричних міркувань. Ми отримали такий розподіл безпосереднього сусіда на сфері і вираз для середньої відстані між ними

$$\langle R \rangle = 1/2(3,2R_m) / (\pi d)^{1/2} [1 - \exp(-n)]$$

де $I(\cdot)$ неповна Γ -функція, d -площа, що припадає на молекулу пігменту, n -кількість молекул на міцелі. Розрахунки показали, що для міцел всіх досліджених детергентів, навіть при максимальних значеннях n , просто поверхнева локалізація молекул пігменту навіть без врахування ефектів асоціації характеризується суттєво більшими значеннями $\langle R \rangle$ ніж R наведені в таблиці 5. З цього випливає, що просто поверхнева локалізація пігментів малоймовірна. В міцелях TX-100, дезагрегація пігментів менша порівняно з ЦТАБ і ДСН, виявилось, що для числа посадки $n=7-13$ при глибині заглиблення молекул в гідрофільний шар на 0,5-1 нм, розраховані середні відстані між сусідніми молекулами становлять $\langle R \rangle = 3,2-2,2$ нм. Ці оцінки досить близькі до величин R для TX-100 при $Z=10$,

Таблиця 5. Основні характеристики і параметри переносу енергії між пігментами в мицеллярних системах.

Донорно-акцепторна пара	тип мицеля	Z	$\frac{Z_{PDL}}{Z_{Xl}}$	B_{DO}	$\epsilon_A^{Макс}$ $M^{-1}cm^{-1}$	n	$\int(V)$ $cm^{-4}M^{-1}$	$R_{ET}^{теор}$ нм	$\Phi_{ET}^{туш}$	$\Phi_{ET}^{сенси}$	\bar{R} нм
Хл→Хл	ТХ-100	2	-	0,29	62000	1,46	$4,2 \cdot 10^{-13}$	5,0	-	-	
ПХл→ПХл		2	-	0,13	26000	1,46	$1,3 \cdot 10^{-13}$	3,6	-	-	
ПХл→Хл		2	1:1	0,13	62000	1,46	$3,5 \cdot 10^{-13}$	3,9	0,035	0,04	6,8
ПХл→Хл		10	1:1	0,05	60000	1,46	$3,1 \cdot 10^{-13}$	3,3	0,54	0,50	3,3
ПХл→Хл		10	2:1	0,04	60000	1,46	$3,1 \cdot 10^{-13}$	3,2	0,66	0,57	3,0
Хл→Хл	ДСН	2	-	0,14	46000	1,39	$3,0 \cdot 10^{-13}$	4,3	-	-	
ПХл→ПХл		2	-	0,03	16000	1,39	$0,5 \cdot 10^{-13}$	2,5	-	-	
ПХл→Хл		5	2:1	0,02	46000	1,39	$0,8 \cdot 10^{-13}$	2,5	0,14	0,09	3,5
Хл→Хл	ЦГAB	2	-	0,19	54000	1,40	$3,5 \cdot 10^{-13}$	4,7	-	-	
ПХл→Хл		2	-	0,04	19500	1,40	$0,97 \cdot 10^{-13}$	2,9	-	-	
ПХл→Хл		8	2:1	0,02	54000	1,40	$3,2 \cdot 10^{-13}$	3,2	0,43	0,33	3,5

отриманих із даних по передачі енергії. Для міцел ПТАВ і особливо ДСН оцінки R менше визначені через значну агрегацію пігменту, однак і в цих системах краща згода з експериментальними величинами досягається при шаровому розташуванні соліобілізованих молекул.

Як модельну донорно-акцепторну пару вивчали також родамін 6Ж /Р 6Ж / і Фео в міцелах ДСН. Р 6Ж в воді знаходиться у вигляді додатно заряджених іонів і легко соліобіліається міцелами ДСН. Спектральні параметри Р 6Ж в міцелах ДСН / ν -0,82, τ -4,7 нс, $\lambda_{\text{max}}^{\text{D}}$ -533 нм, $\lambda_{\text{max}}^{\text{M}}$ -559 нм /, дозволяють зробити висновок, що при Z-встані Р 6Ж в міцелах ДСН в монсмерній. Критична відстань передачі енергії R_0 -44,5 нм. Сумісна соліобіліація молекул Фео /Z- 4/ і Р 6Ж /Z- 2/ проявляється в тушіння флуоресценції донора / ν / ν_0 -0,713, τ/τ_0 -0,9 / та сенсбілізації випромінєння акцептора. Ефективність передачі енергії, знайдена по тушінню флуоресценції Р 6Ж, Φ -0,29, а по сенсбілізації випромінєння Фео Φ -0,31, тобто з урахуванням похибок експерименту, ці величини співпадають. Середня відстань між взаємодіючими хромофорами при даному Z становить 48-50 А. При радіусі міцел 35 А з урахуванням шару Штерна і пуассонівського розподілу молекул по міцелах, знайдене R відповідає поверхнево-шаровій локалізації хромофора. Диполь-дипольна передача енергії електронного збудження детектується як іро перевернуто передачу при зіткненні, що веде до швидкої термалізації збудження і має константу $F > K_d$. Для цього необхідно виконання умови $L < 1/3R_0$. Діяючий шлях молекул пігменту в такому випадку 6-8 А, тобто термалізація при зіткненні можна анексувати.

Відмітимо ще раз концентрувчу здатність міцел. Так при Z-2 відстані між молекулами не перевищують $2R_m$. В цьому випадку легко отримати такий розподіл відстаней між двома молекулами на сфері $W(R)=2\pi R/4\pi R_m^2$, а середня відстань $\langle R \rangle=4/3R_m$. Для міцел ТХ-100 / R_m -50 А/ при Z-2 $\langle R \rangle=60$ А, для ізотропного розчину це відповідає концентрації 10^{-3} М, а для ПТАВ і ДСН ще вище. При збільшенні Z середня відстань між найближчими молекулами на сфері зменшується як $1/\sqrt{Z}$. Таким чином локальна концентрація пігмента в міцелах на кілька порядків перевернуто об'єму концентрації в розчині.

В міцелах ТХ-100 при Z-10 ефективність міграції між P_{H1} і X_{H} досягає значень F - 2-4 10^8 с^{-1} . Такі ж параметри передачі енергії для пари $P_{\text{H1}}-X_{\text{H}}$ реаліаються в ізотропних розчинах касторової олії при C -7-9 10^{-3} М. / Зеньківич и др. 1975 /. В той же час в

амішаних асоціатах Пхл і Хл імовірність міграції суттєво вища $P-4 \cdot 10^{12} \text{ c}^{-1}$ навіть при дуже низькому квантовому виході флуоресценції Пхл /Зенькевич и др. 1977 /. Названі дані по вивченню міграції енергії в гомогенатах етіологованих рослин при 77 К показали, що при співвідношенні Пхл:Хл 1:1 ефективність передачі енергії може досягати $\Phi=0,7$, правда вона залежить від стадії формування фотосинтетичного апарату /Брадкіи и др 1981 /. Це дає підстави зробити висновок, що міцелярні системи досить добре моделюють енергетику взаємодій між цими пігментами в нативних структурах і можуть бути використані для прояснення окремих питань формування апарату фотосинтезу.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що Пх ІХ в комплексі з протеїноїдом міг слугувати як примітивний реакційний центр. В ас-яку з невисоким значенням $K_D=37 \text{ A}$ для гомогенної передачі енергії між молекулами Пх ІХ і відповідно низької імовірності передачі енергії в антені з таких молекул обґрунтовано припущення, що супутні пігменти меланоїдини могли виконувати роль антени і слугувати екраном від УФ випромінювання.

2. Показано, що сольбілізація пігменту міцелями ПАР характеризується дезагрегацією асоціатів пігментів і підвищенням локальної концентрації хромофорів на 2-3 порядки порівняно з об'ємною концентрацією в розчині. Дезагрегуюча дія мицел по відношенню до агрегатів Хл і Пхл зменшується при переході від ІХ-100 до ЦТАВ і ДСН. В мицелях ДСН виявлені агрегати Пхл з довгохвильовим максимумом поглинання 670 нм і флуоресценції 680 нм, які не вдається отримати в звичайних розчинах і бінарних сумішах. У випадку Фео виявлена стабілізуюча дія індиферентного електроліту, що забезпечує стабілізацію мономерних молекул в мицелях іоногенних ДСН і ЦТАВ при широкій варіації чисел посадки.

3. Встановлено, що специфічна взаємодія молекул пігменту з мицелями визначає переважно жорстку фіксацію Хл і його аналогів в поверхневому збагаченому водно-ліпідному шарі мицел, що не приводить до суттєвих змін імовірності внутрімолекулярних процесів дезактивації в мономерних. Спектральні аспекти по відношенню до ізоотропних розчинів пігментів в органічних розчинниках визначаються сольватохромними ефектами в умовах термічних флуктуацій поверхні мицели, а при збільшенні посадки пігментів на мицелу деякий вклад вносять також

і екситонні взаємодії.

4. Показано, що з ростом числа хромофорів в міцелах забезпечуються умови для передачі енергії по механізму індуктивного резонансу. На дивлячись на гетерогенний характер міцелярних комплектів, реалізується добра відповідність теорії і експерименту. Міцелярні системи, що містять пару Пхл-Хл можна використовувати для моделювання енергетики взаємодій між цими пігментами в нативних структурах.

5. На основі експериментальних даних по передачі енергії між пігментами і розподілу відотаней між найближчими сусідами, розроблена модель для визначення локалізації молекул в сферичних структурах. Цим методом показано, що хлорофилі макроцикли локалізуються в поверхневому шарі міцел.

6. Показано, що будова і динамічні властивості міцел забезпечують високу рухливість ксиона, що оприяє його взаємодії зі збудженими хромофорами, в $K^T_{cl} = 0,9-4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ для міцел різних ПАР. Константа швидкості тушіння S-станів в 10-100 разів більша ніж T-станів. Припускається, що середовище відіграє активну роль і може одгукувати як медіатор електронного переносу.

СПИСОК ОСНОВНИХ РОБІТ ОПУБЛІКОВАНИХ ПО МАТЕРІАЛАХ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Сиван О.О., Лозова Г.І. Вивчення властивостей хлорофілу в в'язучих комплексах // Тези доп. IV Укр. біохім. з'їзду. 1982, Дніпропетровськ, ч. II. - С. 76.

2. Сиван А.А., Калинук Т.В., Лозова Г.И. Влияние белка на фотохимическую активность хлорофилла в мицелах детергентов // Биосфера. 1984. т. 29, в. Б.С. 903-904.

3. Лозова Г.И., Сиван А.А. Моделирование абиогенных пигментных фотокаталитических систем // Тезисы Всесоюз. конф. "Современные пробл. эволюционной биохимии и происхождения жизни" Петроавдодск. - С. 62.

4. Сиван А.А., Зенькевич Э.И., Зенькевич Т.В. Зависимость энергетических параметров пигментов от их организации в водных системах ПАВ // Тезисы Всесоюз. конф. молодых ученых "Современ. проблемы биохимии и физ. хим. биологии". 1985. Звенигород.

5. Сиван О.О. Специфіка комплексоутворення хлорофілу і хлорофіліду в білках // Укр. ботан. журн. 1985 т. 42, N 2. С. 41-44.

6. Зенькевич Е.І., Сиван О.О., Зенькевич Т.В., Лозова Г.І.

Енергетика і спектрально-люмінесцентні властивості фотосинтетичних пігментів у міцелах детергентів// Укр. ботан. журн. 1985 т. 42, №3.-С. 69-72.

7. Сиваш О.О., Зенькевич Е.І., Зенькевич Т.В. Хлорофіл та його аналоги в міцелах детергентів//Тези V Укр. біохім. з'їзду, -1987. Івано-Франківськ Ч II, С. 211.

8. Lozovaya G.I., Sivash A.A. The modeling of functional activity prebiological systems//In: Towards a new synthesis in evolutionary biology.-1987 Praha.-P.93-98.

9. Зенькевич Е.І., Сиваш О.О., Зенькевич Т.В. Передача енергії між пігментами в міцелах різних детергентів// Укр. ботан. журн. 1988. т.45, № 4.-С. 40-45.

10. Каневський В.А., Сиваш А.А. Структура сонячного спектра і механізми фоторегуляції в біології//Преприят Інститута ботаніки ім. Н.Г. Холодного АН УРСР. 1988. 20 С.

11. Зенькевич Е.І., Сиваш О.О., Зенькевич Т.В. Солюбілізація фосфітину а в міцелах різних детергентів і взаємодія його з молекулами пігментів та барвників// Укр. ботан. журн. 1989. т.46, № 3, -С.51-56.

12. Masinovsky Z., Lozovaya G.I., Sivash A.A. Porphyrin-proteinoid complex as a model photosensitizer//BioSistems -1989. V. 22, N 2.P. 305-310.

13. Masinovsky Z., Lozovaya G.I., Sivash A.A. Porphyrin-proteinoid complex as a possible photosensitizer// IV Meeting of ISSOL. Pragu.-1989.-P.186-197.

14. Sivash A.A. Aqueous micelles solution as model system for energy transfer between photosynthetic pigments//Ibid.-P.96-97.

15. Лозова Г.І., Масиновський З.Б., Сиваш О.О. Спектральні та фотохімічні властивості порфіринів у комплексах з білком // Укр. ботан. журн. 1980. т.47, №4.-С. 58-61.

16. Лозова Г.І., Масиновський З.Б., Сиваш А.А. Ранняя эволюция фотобиологических процессов//Преприят Інститута ботаніки ім. Н.Г. Холодного АН УРСР. 1990. 60 С.

17. Telegina T.A. Masinovsky Z. Sivash A.A. et al. Proteinoids as complex of amino acids with melanoidins// Origins of Life 1990.-v.20.P. 269-277.

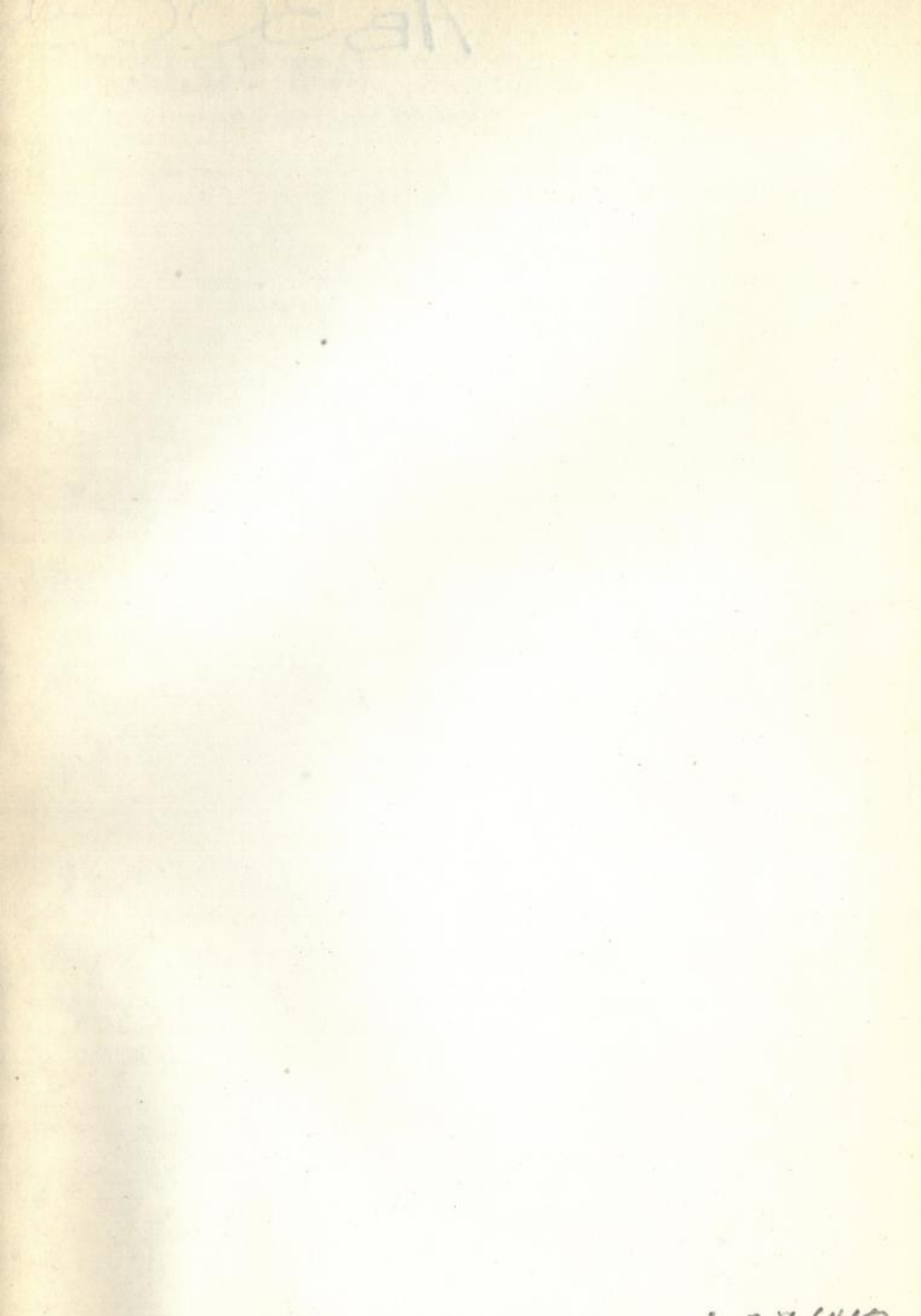
18. Lozovaya G.I., Masinovsky Z., Sivash A.A. Protoporphyrin IX as a possible ancient photosensitizer: Spectral and photochemical studies // Origins of Life 1990.-v.20.P.321-330.

19. Sivash A.A., Masinovsky Z., Lozovaya G.I. Surfactant micelles containing protoporphyrin IX as a models primitive photocatalitic systems: a spectral study//BioSystems 1991,V.26. -P.131-140.

20 Masinovsky Z., Lozovaya G.I., Sivash A.A. Some aspects of the early evolution of photosynthesis// Advance of Space Research 1992. V.12, N.4. -P. 199-205.

21. Месинковский Э.В., Логовая Г.И., Сиваш А.А. Моделирование эволюционного становления фотосинтетических систем на примере протопорфирина IX содержащих комплексов//ДАН Укриня 1992. N 4. -С. 129-133.

Э.В. Месинковский



AB 30.034