

ПРОБЛЕМЫ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ БИОФИЗИКИ

Оглавление

1. Экологическая биофизика в ряду экологических дисциплин.

2. Адаптация и устойчивость биологических систем.

2.1. Адаптация, устойчивость и надежность биологических систем.

2.2. Молекулярные механизмы адаптации живых организмов к экстремальным факторам внешней среды.

2.3. Энергетическая стоимость физиологических процессов.

2.4. Стресс.

3. Влияние фоновых воздействий на биологические системы.

3.1. Фоновые воздействия.

3.2. Действие на организм сверхмалых доз биологически активных веществ.

3.3. Действие электромагнитных полей на биологические системы.

3.4. Влияние солнечной активности и магнитного поля Земли на биологические системы.

3.5. Атмосферное электричество.

3.6. Физиологическое действие аэроионов.

3.7. «Макроскопические флуктуации» гистограмм распределений.

4. Влияние оптического излучения Солнца на биологические системы.

4.1. Оптическое излучение Солнца.

4.2. Свойства электронно-возбужденных состояний.

4.3. Восприятие света человеком.

4.4. Биологические эффекты действия оптического излучения

4.5. Фоторецепция и фоторегуляция растений и микроорганизмов.

4.6. Фотоиндуцированное движение клеток водорослей.

4.7. Биологические эффекты действия монохроматических излучений.

4.8. Биологические часы.

5. Активные формы кислорода в повреждении и защите организма.

5.1. Активные формы кислорода.

5.2. Повреждение ДНК с участием АФК.

5.3. Повреждение белков с участием АФК.

5.4. Перекисное окисление липидов.

5.5. Защита организма от окислительного повреждения.

5.6. ПОЛ субклеточных структур растений.

5.7. ПОЛ при действии гербицидов и старении растений.

5.8. Роль АФК в реакциях иммунитета.

5.9. Защита организма от ксенобиотиков и система цитохромов P450.

6. Экология фотосинтеза и пигменты растительных организмов.

6.1. Экология фотосинтеза.

6.2. Фотосинтез в водных экосистемах.

6.3. Состав и организация фотосинтетических пигментов.

6.4. Фотозащитные пигменты растительных организмов.

6.5. Оптические свойства растительных организмов.

6.6. Абсорбционные методы оценки содержания пигментов в природном фитопланктоне и растворенном в воде органическом веществе.

7. Регуляция первичных процессов фотосинтеза

7.1. Общая характеристика первичных процессов фотосинтеза.

7.2. Особенности регуляции системы ППФ

7.3. Окислительное повреждение ФСА растительных организмов.

7.4. Диссипация энергии света как механизм защиты растительных организмов.

7.5. Особенности фотосинтеза цианобактерий.

8. Методы определения состояния фотосинтетического аппарата.

8.1. Флуоресценция хлорофилла ФСА.

8.2. Длительное послесвечение хлорофилла ФСА.

8.3. Термохемилуминесценция фитопланктонных организмов.

8.4. Изменение функциональных характеристик фотосинтетического аппарата Th. w. в процессе роста клеток в накопительной культуре.

8.5. Примеры определения функционального состояния ФСА природного фитопланктона по параметрам флуоресценции хлорофилла.

8.6. Примеры определения функционального состояния древесных растений по характеристикам флуоресценции хлорофилла коры однолетних побегов.

9. Связь структуры популяции с ее состоянием.

9.1. Разнообразие ответных реакций индивидуумов в клеточных ансамблях и популяциях.

9.2. Структура клеточной популяции как отражение ее функционального состояния.

- 9.3. Связь функциональной структуры популяции с динамикой численности одноклеточных водорослей.
- 9.4. Связь функциональной структуры популяции одноклеточных водорослей с дефицитом биогенов или присутствием токсических веществ.
- 9.5 Влияние фотоокислительного повреждения на неоднородность клеток водорослей в популяции.
- 9.6. Изменения параметров флуоресценции хлорофилла двух видов водорослей при их совместном культивировании.
- 9.7. Оценка состояния популяции и прогнозирование динамики численности природных популяций водорослей на основе неоднородности клеток.
- 9.8. Типизация особей в популяциях.
- 10. Проблемы оценки состояния среды и перспективы развития инструментальных систем экологического мониторинга.**
- 10.1. Проблема оценки состояния среды обитания.
- 10.2. Технологические перспективы мониторинга природных вод. Перспективы использования флуоресцентных методов в экологическом мониторинге
- 10.3. Аппаратура для определения состояния ФСА растительных объектов по показателям флуоресценции хлорофилла.
- 10.4. Многоуровневая система экологического мониторинга прибрежных акваторий.
- Литература.

С.И.Погосян
ПРОБЛЕМЫ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ БИОФИЗИКИ

Учебное пособие подготовлено на основе спецкурса, читаемого автором на кафедре биофизики биологического факультета МГУ. В данном пособии суммированы различные стороны взаимодействия организма со средой на уровне макромолекул и макромолекулярных комплексов, строения и функционирования мембранных структур, клеточных органелл, клеток, а также клеточных ансамблей, популяций и их сообществ.

В начале пособия представлен раздел, в котором рассмотрены общие представления об адаптации, устойчивости и надежности биологических систем. Далее даны представления о проблемах, возникающих при выявлении механизмов влияния некоторых фоновых воздействий среды на организмы. Большое внимание в пособии уделено действию оптического излучения и активных форм кислорода на различные биологические структуры и организмы в норме и при неблагоприятных условиях. Рассмотрены проблемы оценки состояния среды. Подробно изложен раздел, посвященный экологии фотосинтеза и методическим возможностям использования реакций фотоавтотрофных организмов для экологического мониторинга состояния среды. Особое внимание и подробное изложение последнего раздела обусловлено тем, что этот кластер в возможных системах слежения за состоянием среды детально разработан и наиболее полно удовлетворяет современным требованиям к многоуровневым системам экологического мониторинга будущего.

Пособие предназначено для студентов биологических специальностей, аспирантов, преподавателей, специалистов в области биофизики, экологии, физиологии, гидробиологии, и др.

¹ **Принятые сокращения:** АТФ – аденозинтрифосфат; АФК - активированные формы кислорода; ХЛ – хлорофилл; МДА – малоновый диальдегид; ПОЛ – перекисное окисление липидов, РЦ - реакционные центры; ТХЛ - термохемилюминесценция; ФАР - фотосинтетически активная радиация; ФС - фотосистема; ФСА - фотосинтетический аппарат; Fo - интенсивность флуоресценции ХЛ при открытых РЦ; Fm - интенсивность флуоресценции ХЛ при закрытых РЦ; Fv = Fm – Fo - переменная флуоресценция ХЛ; (Fm – Fo)/Fm - относительная переменная флуоресценции ХЛ; ЭТЦ - электронтранспортная цепь; qN - коэффициент нефотохимического тушения ХЛ.

1. Экологическая биофизика в ряду экологических дисциплин.

Обычно будущее планируется исходя из экстраполяции прошлых тенденций. Такой линейный подход часто является вполне оправданным. Но иногда прогнозы полностью расходятся с действительностью. За периодами гладких изменений следуют катастрофы. В настоящее время представления о нелинейности множества процессов вытесняют детерминистское однозначное представление о законах природы, унаследованное со времен Возрождения. Тем не менее, мысль о том, что цивилизация может разрушиться сама собой, кажется абсурдной. Однако пристальное рассмотрение мировых тенденций развития сельского хозяйства, экономики, изменений численности населения и окружающей среды позволяют полагать, что продолжение развития Человечества в избранном линейном направлении с большой вероятностью приведет к серьезному кризису нашей цивилизации. Во второй половине XX века к интеллектуальной элите пришло понимание ограниченности земных ресурсов.

Бескризисное развитие нашей цивилизации ставит перед естественными науками три главные проблемы:

обеспечение Человечества продуктами питания;

обеспечение здоровья и долголетия человека;
сохранение благоприятных для Человечества условий обитания на Земле.

Следует отметить, что обеспечение Человечества продуктами питания в большой степени ограничено недостатком водных ресурсов, потерями плодородия почв и ухудшением экологического состояния сельскохозяйственных угодий. Одной из главных негативных причин ухудшения здоровья людей является загрязнение воды, воздуха и продуктов питания. Таким образом, сохранение и улучшение состояния среды обитания является одной из самых актуальных проблем Человечества и наук экологического профиля.

Экология как наука о взаимодействиях организмов между собой и с окружающей средой включает в себя множество аспектов, заслуживающих пристального изучения. За последние годы произошла «экологизация» многих наук. Появились учебники по Физической, Химической, Биохимической и Генетической экологии др. Такая тенденция оправдана общими закономерностями развития науки в целом и ее экологического направления в частности.

Исторически наука развивалась от естествознания, когда не было деления на научные дисциплины, к чрезвычайно высокому уровню специализации нашего времени. Это привело к сильнейшей изоляции разных научных направлений, когда ученые разных специальностей практически перестали понимать друг друга. Сейчас насущной задачей дальнейшего развития науки, видимо, должна стать интеграция знаний и переход к естествознанию на новом уровне, когда в центр исследований ставится всестороннее и интегрированное познание объекта.

Биофизика - наука о наиболее простых и фундаментальных механизмах взаимодействия, лежащих в основе биологических явлений, способна в комплексных исследованиях способствовать решению ряда вопросов экологии. Экологическая биофизика объединяет знания о физико-химических механизмах протекания биологических процессов в изменяющихся условиях среды и информацию, накопленную в результате наблюдений за состоянием различных объектов в природе, начиная с индивидуальных организмов вплоть до популяций и ценозов.

Целью экологической биофизики являются:

выявление механизмов влияния факторов среды на состояние биологических объектов;
выяснение физико-химических механизмов адаптации и устойчивости организма к условиям среды;
выявление путей регуляции для поддержания устойчивого развития экосистем;
разработка физико-химических методов биотестирования, биоиндикации и экологического мониторинга среды обитания;
создание методов прогнозирования развития биоценоза при изменениях условий среды;
разработка принципов построения экологически чистых биотехнологических процессов.

В последнее время большое значение приобрела концепция влияния «слабых воздействий», которые по интенсивности сопоставимы с воздействиями, характерными для среды обитания организма. Исследованиями механизмов «слабых воздействий» биофизика может существенно углубить понимание многих экологических явлений. Большое внимание в данном пособии уделено действию на биологические объекты солнечного излучения оптического диапазона, окислительному повреждению и роли активных форм кислорода. Одной из главных тем в данном курсе является экология фотосинтеза водных экосистем и разработка биофизических методов экологического мониторинга, биоиндикации и биотестирования. На примере этих наиболее глубоко разработанных подходов демонстрируются перспективы развития методов экологического мониторинга. Рассмотрены возможности использования абсорбционных методов для определения состояния высших растений и природного фитопланктона. В заключение обсуждается проблемы оценки состояния среды обитания. Показано, как биофизические подходы и методы могут быть использованы для оптимизации фотобиотехнологических процессов очистки сточных вод, получения различных полезных продуктов и, в том числе, биотоплива.

Математическое моделирование, давно и прочно занявшее свое место в синэкологии (биоценологии) для описания взаимодействия видов в ценозе и со средой не рассматривается в данном учебном пособии, так как излагается в отдельном курсе лекций. Также в отдельных курсах рассмотрены вопросы радиационной биофизики и радиационной экологии. Эти разделы не представлены в данном пособии.

2. Адаптация и устойчивость биологических систем

2.1. Адаптация, устойчивость и надежность биологических систем

Важнейшими терминами, используемыми в биологии и различных ее разделах, являются: адаптация, устойчивость и надежность биологических систем. Мы имеем интуитивные представления об этих широко употребляемых терминах. Многие из этих терминов определяются разными авторами по-разному и предполагают некоторую неопределенность. Поэтому представляется необходимым пояснить, что имеется в виду под каждым используемым термином.

Адаптация – генетически обусловленная способность организма изменяться в направлении, увеличивающем его шансы на выживание и размножение в данных условиях среды. *Генетическая адаптация* представляет собой изменения, проходящие за время жизни многих поколений. Благодаря этим

изменениям сформировалась современная популяция какого-либо вида. Мутации приводят к изменениям базальных концентраций ферментов, новых изотимов и появлению низкомолекулярных продуктов, обеспечивающих адекватную реакцию организма на смену условий обитания.

Существуют две стратегии физиологической адаптации к неблагоприятным условиям среды: повышение резистентности (сопротивляемости, устойчивости) или увеличение толерантности (переносимости, выносливости). Простые организмы часто реализуют толерантную стратегию, тогда как высокоорганизованные организмы реализуют резистентную стратегию, хотя большинство млекопитающих при необходимости могут использовать для выживания обе стратегии. Метаболической основой для реализации резистентной стратегии является преобладание катаболизма над анаболизмом. При этом происходит мобилизация всех энергетических ресурсов и их расходование на компенсаторно-приспособленные нужды организма. Хотя эта стратегия биологически целесообразна, однако она неэкономична, расточительна. Стратегия толерантности характеризуется минимизацией функций основных жизненно важных физиологических систем. Она направлена на сохранение жизни в крайне неблагоприятных условиях, а не на поддержание нормального метаболизма в новых условиях. Главное достоинство данной стратегии – выживание.

Фенотипическая адаптация происходит в течение жизни организма в условиях неизменного генома. В результате фенотипической адаптации организм получает новые свойства в отношении каких-либо факторов среды и приобретает способность выживать или более эффективно функционировать при действии этих факторов. Фенотипическая адаптация направлена на поддержание основных, фундаментальных функций организма. Такая реакция организма характерна для всех живых систем.

Акклиматизация – это такой адаптационный процесс, при котором организм приспосабливается к новым для себя условиям среды за достаточно большое время, за которое может произойти синтез новых белков и перестройка мембранных структур.

Немедленная адаптация происходит настолько быстро, что она не может быть связана с экспрессией генов или значительными перестройками клеточных структур за счет синтеза каких-либо веществ. Как правило, такая адаптация осуществляется путем модуляции активности уже имеющихся ферментов и других макромолекулярных комплексов. Таким образом, организм располагает несколькими способами приспособления к новым для себя условиям, как в ответ на кратковременные, так и долговременные изменения среды.

Любые способы адаптации, какими бы ни были их времена, могут приводить к восстановлению функций (за счет количественных или качественных изменений макромолекул, их микроокружения или скоростей ферментативных реакций) или к приобретению организмом новых благоприятных для него свойств. Если адаптация завершается восстановлением функций организма, нарушенных влиянием среды, то ее принято называть *компенсаторной*. Примерами такой адаптации являются изменения состава жирных кислот мембранных липидного у организмов, приспособленных к холоду или к теплу и направленные на поддержание функций мембран. Однако адаптация в ряде случаев может приводить к радикальным изменениям метаболизма, придающим организму новые для него свойства, например, переход клетки в состояние цисты.

Зона толерантности принято считать такой диапазон внешнего воздействия, при котором организм способен поддерживать гомеостаз. Закономерные реакции организма на воздействия, превосходящие границы толерантности, как правило, приводят к задержке деления клеток, торможению синтеза белка и снижению энергообмена. Типичным примером такого ответа организма является его реакция на тепловой шок. При достижении критической для данного организма температуры включаются системы синтеза белков теплового шока за счет снижения скоростей других синтетических реакций. При этом ухудшаются условия функционирования многих метаболических процессов.

Переход организма из зоны толерантности в новое состояние, характеризующееся структурно-функциональной перестройкой, направленной на сохранение живой системы. До определенного уровня воздействия эти перестройки обратимы. Как правило, возвращение в исходное состояние протекает медленнее, чем при выходе из зоны толерантности. Ответ на повторное воздействие приводит к более быстрой и эффективной перестройке метаболизма организма за счет создания «системного структурного следа» – клеточной памяти.

Устойчивость – термин, очень широко используемый в биологии. В физике устойчивым считается такое состояние системы, к которому она самопроизвольно возвращается, будучи выведена из него внешними силами. Восстановление исходного состояния за счет того, что оно обладает наименьшим уровнем свободной энергии. Это касается систем, у которых отсутствуют механизмы регуляции поступления и расходования энергии по принципу обратной связи. При наличии обратной связи могут быть устойчивыми и такие состояния, когда содержание свободной энергии отличается от минимального уровня. В литературе встречаются различные смыслы понятия «устойчивость» в биологии вообще и в отношении терминов «устойчивость экосистемы», «устойчивость популяции» и «устойчивость организма» в частности. Устойчивость какой-либо системы – это способность поддерживать постоянство важных для ее существования параметров при изменениях среды за счет специальных механизмов регуляции. Важнейшим элементом механизма регуляции является обратная связь. Отказ в работе механизмов регуляции организма соответствует такому состоянию организма, когда он перестает сопротивляться внешним нагрузкам.

Последствия перехода границ критических состояний часто необратимы и летальны. Устойчивость экосистемы может быть определена, как ее способность противостоять колебаниям среды и сохранять свою структурно-функциональную целостность. Для оценки устойчивости экосистемы могут вводиться различные количественные критерии. Часто в качестве критерия устойчивости экосистемы используют различные способы количественной оценки видового разнообразия. Сообщество можно считать устойчивым, если число составляющих его видов не меняется в течение длительного времени. Видимо, наиболее приемлемым критерием устойчивости является продукция экосистемы, отражающая конечный результат сложной системы отношений элементов в системе и потоки энергии в ней. Однако не ясно, какие отклонения продукции и энергетических потоков в экосистеме позволяют считать, что ее устойчивость нарушена.

Принято считать, что устойчивость популяции (совокупности особей одного вида, находящихся во взаимодействии между собой и населяющих общую территорию) – это ее способность адекватно реагировать на изменение внешних условий и находиться в состоянии динамического равновесия со средой. В ответ на изменения условий среды происходят адекватные изменения популяции, а при возвращении к исходным условиям популяция также восстанавливает свои свойства. Одним из важнейших условий устойчивости популяции является внутреннее разнообразие особей в ней. В отличие от устойчивости – *стабильность* предполагает способность сохранять свои свойства, несмотря на изменения внешней среды. Однако термин «стабильность» редко используется. Возможно, это обусловлено тем, что оба понятия – «устойчивость» и «стабильность» в английском языке не различаются.

Устойчивости биологических сообществ и популяций посвящены широкомасштабные исследования, проводимые методами математического моделирования. В ряду этих исследований особо следует отметить книги: Ю.М.Свирижеви Д.О.Логофет «Устойчивость биологических сообществ», 1978 г.; Г.Ю.Ризниченко, А.Б.Рубин «Биофизическая динамика продукционных процессов», 2004 г.; «Экосистемы в критических состояниях» Под ред. Ю.Г.Пузаченко. М.: Наука, 1989. – 155 с.

Устойчивость биологического объекта – его способность противостоять воздействию экстремальных факторов среды. Устойчивость выявляется только при действии экстремального фактора. Под биологической устойчивостью объекта понимают его выживание в условиях, когда другие погибают. В то же время в растениеводстве различают биологическую устойчивость, под которой понимают выживание, и агрономическую устойчивость, понимаемую как степень снижения урожая. Устойчивость объекта генетически детерминирована. В то же время она может меняться в онтогенезе, а также при адаптации и стрессе, как одной из форм проявления адаптации. Для определения устойчивости необходимы прямые испытания в сопоставлении с другими объектами. При определении агрономической устойчивости, как правило, из комплекса признаков выбирают те, которые в большей степени отражают повреждение организма. Естественно, возникает вопрос, какие изменения в организме следует считать признаками повреждения, а какие защитно-приспособительными? К сожалению, однозначного ответа на этот вопрос нет.

Некоторые авторы считают, что переживание неблагоприятных условий обеспечивается комплексом неспецифических адаптивных процессов, независимых от природы воздействия. В пользу такой точки зрения склоняют факты «перекрестной» устойчивости. Доведение этой позиции до абсурда приводит к предположению о существовании единой для всех экстремальных условий устойчивости, что не соответствует фактическим данным.

Физиологи растений различают множество видов устойчивости: морозо-, холодо-, жаро-, засухо-, газо- (O_3 , SO_2 , NH_4), тяжелые металлы, углеводороды, гербициды и т.д. Такой путь малопродуктивен так, как приводит, например, к необходимости рассмотрения устойчивости к определенным температурам (-15, -5, +5 °C) или к определенным концентрациям солей. В связи с этими трудностями проблему устойчивости пытаются решить с позиций теории надежности.

Надежность

Надежность – способность системы выполнять определенные функции с заданными характеристиками в определенных условиях в течение заданного времени. Согласно концепции надежности элементы системы могут находиться либо в рабочем, либо в нерабочем (отказ) состоянии. Из теории надежности следует, что построенная из малонадежных элементов система за счет резервирования и ремонта неисправных элементов может обладать высокой надежностью. Однако реализовать аппарат теории надежности и рассчитать надежность биологических систем пока не удастся. Тем не менее, некоторые общие положения теории надежности уже сейчас оказываются весьма полезными [Гродзинский]. Понятие надежности может быть применено к различным уровням организации биологических систем: экосистема, популяция, организм, клетка, геном и клеточные структуры. Часто под надежностью природной системы понимают ее способность практически бесконечно функционировать без резких изменений структуры и функции.

Высокая надежность биологических систем обусловлена следующими факторами:
высокой надежностью генома (двухспиральность ДНК, многоядерность, многоплоидность);
избыточностью структурных элементов;
альтернативными путями метаболизма;
резервированием субстратов и продуктов метаболизма;

системами репарации повреждения;
структурной и функциональной генетической и эпигенетической гетерогенностью ансамблей клеток и индивидуумов в популяции;
стрессом, приводящим к повышению устойчивости.

2.2. Молекулярные механизмы адаптации живых организмов к экстремальным факторам внешней среды.

Молекулярные механизмы адаптации направлены на:

поддержание структурной целостности макромолекул (белков, нуклеиновых кислот и мембранных структур);

достаточное снабжение энергией (АТФ), восстановленными эквивалентами и субстратами для синтетических целей;

поддержание систем, регулирующих скорости и направление метаболических процессов в соответствии с потребностями организма в изменяющихся условиях среды.

Рис.

В процессе фенотипической адаптации во многих случаях поддерживается не состояние определенных структур, а их функции. Например, вязкость мембран хотя и изменяется с температурой, но таким образом, чтобы могли нормально функционировать связанные с мембраной ферменты; концентрации растворенных в клетке веществ регулируются для поддержания структуры и нормальной работы ферментов.

Можно выделить три типа процессов фенотипической адаптации:

1. Приспособление макромолекулярных компонентов клеток, приводящее к изменению количества уже имеющихся макромолекул или образованию новых компонентов, более приспособленных к изменившимся условиям (например, изозимов или таких ферментных систем, как цитохром Р-450, супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы, обеспечивающих защиту клетки от вредных для нее веществ). Такая адаптация, как правило, сопряжена с экспрессией генов. Типичным примером этой адаптации является приспособление сорняков к действию ряда гербицидов. Сорняк обычно погибает при воздействии на него наиболее широко применяемого в сельском хозяйстве в настоящее время гербицида Roundup, который блокирует синтез аминокислот ингибируя фермент 5-энолпирувилшикимат-3-фосфат синтазу (EPSPS). Под давлением отбора растения приобретают способность настолько увеличивать количество фермента EPSPS, что гербицид не может выполнить свою функцию. Таким образом, появились «суперсорняки» устойчивые к действию гербицида аналогично тому, как патогенные микроорганизмы вырабатывают устойчивость к антибиотикам.
2. Приспособление микросреды, в которой функционируют макромолекулы. Например, изменения ионного состава протоплазмы, внутриклеточной концентрации водорастворимых углеводов или вязкости мембран у растений в условиях понижения температуры для предотвращения кристаллизации льда в клетках.
3. Метаболическая регуляция, при которой не происходит изменений состава и числа макромолекулярных компонентов. В этом случае адаптацию обеспечивает функциональная регуляция существующей макромолекулярной структуры. Таким примером является регуляция фотосинтетического аппарата растений в условиях быстрого изменения интенсивности облучения.

Рис.

В конкретных условиях могут перечисленные процессы адаптации проявляться, как порознь, так и в различных сочетаниях.

Детальный анализ механизмов и стратегий адаптации к различным факторам среды преимущественно в отношении животных проведен в книге П.Хочачка и Дж. Сомеро «Биохимическая адаптация», 1988 г. Конкретные молекулярные механизмы адаптации организма далее будут рассмотрены на примере адаптации к изменениям температуры среды.

Адаптация белков к изменениям температуры

Температура среды является одним из важнейших факторов, влияющих на распространение вида, скорость физиологических процессов и, в конечном счете, на выживание организма. То, что температура влияет на скорость химических реакций согласно закону Аррениуса, хорошо известно и стало одной из основных догм физической химии. Из закона Аррениуса следует, что чем выше энергия активации реакции, тем сильнее зависит скорость реакции от температуры. Ферментативные реакции имеют низкое значение энергии активации и, как правило, слабую зависимость от температуры. Однако температура оказывает влияние не только на скорость, но и на равновесие реакций. Это касается в особенности тех реакций, в которых образуются нековалентные связи. К этим «слабым» связям относятся вандерваальсовы взаимодействия, водородные связи, ионные связи и гидрофобные взаимодействия. Макромолекулярные структуры стабилизируются слабыми связями, но не жестко, а гибко с возможностью перемещения отдельных частей молекулы для выполнения ее функций. Жесткие структуры не способны к конформационным изменениям, обеспечивающим функционирование макромолекул. Таким образом, нормально функционирующий белок должен быть «полустабилен», т.е. он должен сохранять свою структуру и иметь возможности для конформационных движений. Особое значение для температурных зависимостей имеет то обстоятельство, что с ростом температуры водородные связи, электростатические и

вандерваальсовы взаимодействия ослабляются, а гидрофобные взаимодействия усиливаются. Следует отметить, что суммарная свободная энергия стабилизации, обеспечивающая поддержание нативной структуры белка, составляет 120-200 кДж/мол. По данным Аргоса и др. (Argos et al., 1979) для превращения мезофильного белка в термофильный достаточно изменить лишь одно основание в триплете.

Существуют термофильные организмы, способные жить при температуре близкой к 100 °С. В таких условиях белки, как правило, денатурируют. Устойчивость белков к действию высокой температуры может быть достигнуто введением дополнительных электростатических связей. Например, D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы двух микроорганизмов сохраняющих свою активность до 70 и 95 °С отличается наличием дополнительных электростатических связей (солевых мостиков) у более термоустойчивой формы.

Другой возможный способ повышения термостабильности белков может быть обусловлен значительным числом малых изменений. Например, гидрофобность поверхности белков термофильных бактерий меньше, а внутренних частей – больше, чем у их нетермофильных аналогов. Поскольку при повышении температуры гидрофобные взаимодействия усиливаются, такие изменения, видимо, способствует большей стабильности белков. Гидрофобные области на внешней поверхности молекул белков могут формировать полости активных центров и места контактов субъединиц мультимерных белков друг с другом и биологическими мембранами. Увеличение гидрофобности поверхности белков снижает их внутриклеточную стабильность, так как множество протеолитических ферментов гидролизуют с большой скоростью пептидные связи, образуемые гидрофобными аминокислотами или находящиеся вблизи от них.

Высокая устойчивость белков термофильных организмов обусловлена, скорее всего, отличием в первичной последовательности аминокислотных остатков. Однако в ряде случаев поддержание нативной структуры белка способствуют некоторые защитные системы. К ним относятся шапероны — класс белков, главная функция которых состоит в восстановлении правильной третичной структуры повреждённых белков, а также образование и диссоциация белковых комплексов.

В ответ на тепловой шок в клетках эукариот включается активация транскрипции генов, индуцируемых фактором (фактор теплового шока HSF- heat shock protein). Высокие уровни белков теплового шока в клетке наблюдают после воздействия различных неблагоприятных факторов — при инфекциях, воспалительных процессах, внешних воздействиях токсинов (этанол, мышьяк, тяжелые металлы), при ультрафиолетовом облучении, голодании, гипоксии, недостатке азота (у растений) или нехватке воды. Белки теплового шока называют белками стресса, так как повышение экспрессии соответствующих генов часто наблюдается при ответе на стресс. Точный механизм, по которому тепловой шок активирует экспрессию генов белков теплового шока, до конца не выяснен. Одним из возможных механизмов, приводящих к экспрессии соответствующих генов, может быть снижение вязкости мембран (Лось) Внутриклеточные белки теплового шока экспрессируются в раковых клетках и необходимы для выживания этих клеток.

Белки теплового шока, образуя комплекс с полипептидной цепью, предотвращают их неспецифическую агрегацию и деградацию. В клетках, не подвергшихся тепловому шоку, HSF присутствует и в цитоплазме, и в ядре в виде мономерной формы, связанной с индуцибельным белком теплового шока Hsp70, и не имеет ДНК- связывающей активности. В ответ на тепловой шок, Hsp70 отсоединяется от HSF и начинает укладывать денатурированные белки. HSF собирается в тримеры, у которых появляется ДНК связывающая активность, он и аккумулируется в ядре и связывается с промотором. При этом транскрипция шаперонов в клетке возрастает во много раз. После того, как тепловое воздействие закончилось, освободившийся Hsp70 опять присоединяется к HSF, который при этом теряет ДНК-связывающую активность и все возвращается в нормальное состояние. Активация при многих неблагоприятных воздействиях является важным свойством многих шаперонов. Если же шаперонов не хватает для укладки всех поврежденных белков, то они подвергаются деградации с помощью протеаз и/или агрегирования.

Время существования внутриклеточных белков может различаться на несколько порядков. Структурные и конститутивно экспрессирующиеся белки обычно обладают большой продолжительностью жизни. Регуляторные белки, как правило, быстро распадаются. Среднее время жизни белка в клетке обычно не превосходит 2-3 суток, а в ряде случаев может составлять десятки минут. Протеолитический гидролиз регуляторных белков позволяет клетке быстро переключаться с одной функциональной программы на другую.

Большинство внутриклеточных белков заканчивают существование в результате протеолитического гидролиза, превращаясь в небольшие пептиды и свободные аминокислоты, которые утилизируются в синтезе новых белков. Целесообразность усиления катаболизма обусловлена необходимостью для организма получения достаточное количество мономерных субстратов для синтеза новых веществ, в большей степени соответствующих новым условиям.

Многие протеолитические ферменты используют в качестве субстратов индивидуальные белки. Имеется множество протеиназ широкой субстратной специфичности, чья неразборчивость в отношении субстратов компенсируется их строгой компартментализацией в клетке. Часто такие ферменты локализованы в лизосомах и вакуолях, где гидролизуют любые белки после их попадания в эти органеллы. Такой способ компартментализации протеолитических ферментов является жизненно важным условием существования клетки. Система протеолитической деградации внутриклеточных белков с участием

протеасом и убиквитина отличается от вышеописанных систем тем, что, обладая широкой субстратной специфичностью, она безопасна для окружающих белков и реагирует на регуляторные воздействия.

Наибольшей лабильностью из всех мембрансвязанных белков фотосинтезирующих клеток обладает белок D1 РЦ ФС 2 (молекулярная масса 32 кД). Деградация этого белка, приводящая к фотоингибированию, усиливается при увеличении интенсивности облучения и действии факторов, вызывающих повреждение ФСА. Низкие температуры при высокой инсоляции фотосинтезирующих организмов часто приводят к фотоингибированию. Непосредственной причиной деградации белка D1 могут быть АФК, изменяющие структуру белка. Белок с нарушенной структурой подвергается разрушению с участием мембраносвязанной протеазы. В благоприятных условиях происходит быстрый ресинтез белка D1 и его встраивание в РЦ ФС 2.

Чрезвычайно важным фактором, определяющим адаптацию организма к изменениям температуры, является регуляция вязкости мембранных липидов. Поддержание вязкости имеет решающее значение для выполнения мембранами ряда функций, таких как обеспечение активности мембрансвязанных ферментов и транспорт ионов. Основным фактором, определяющим вязкость мембран, является соотношение ненасыщенных и насыщенных жирных кислот в составе липидов. В таблице 1 представлены температуры плавления наиболее распространенных жирных кислот.

Таблица 1. Температуры плавления наиболее распространенных жирных кислот.

Тривиальное название жирной кислоты	Длина цепи : степень ненасыщенности	Температура плавления, °С
Насыщенные жирные кислоты		
Лауриновая	12:0	44,2
Миристиновая	14:0	53,9
Пальмитиновая	16:0	63,1
Стеариновая	18:0	69,6
Арахидоновая	20:0	76,5
Ненасыщенные жирные кислоты		
Пальмолеиновая	16:1	-0,5
Олеиновая	18:1	13,4
Линолевая	18:2	-5,0
Линоленовая	18:3	-11,0
Арахидоновая	20:4	-49,5

Увеличение числа двойных связей жирных кислот приводит к понижению температуры их плавления. Для того чтобы при снижении температуры мембрана не затвердела, переходя из жидкокристаллического состояния в гель, она должна содержать достаточное количество ненасыщенных липидов. Избыточная подвижность мембран также неблагоприятна для оптимального функционирования мембрансвязанных ферментов и транспорт ионов. Для поддержания нужной вязкости мембраны многие организмы используют активацию или инактивацию ферментов – десатураз, которые перераспределяют соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в составе мембранных липидов путем увеличения числа ненасыщенных связей. У ряда организмов десатураза, сохраняющая активность при низких температурах, быстро денатурирует при повышении температуры. При снижении температуры происходит быстрый синтез десатуразы. Один из предполагаемых механизмов активации десатуразы состоит в том, что при изменении температуры меняется локализация десатуразы в мембране. При относительно высоких температурах десатураза находится в толще мембраны и не проявляет своей активности. При переходе мембраны в более вязкое состояние в результате охлаждения фермент выталкивается на поверхность мембраны и катализирует десатурацию жирных кислот.

Растения имеют разнообразные приспособления к переохлаждению на нескольких уровнях структурной организации. Они дают возможность растениям использовать разные пути адаптации в рамках единой стратегии. Эта стратегия сводится, прежде всего, к предотвращению замораживания протопласта клетки. Снижению температуры замерзания протоплазмы способствует гидролиз крахмала и других запасных полисахаридов, приводящий к увеличению внутриклеточной концентрации водорастворимых углеводов. Необходимой предпосылкой успешной адаптации служит сохранение структурной и функциональной целостности фотосинтетического аппарата. На уровне хлоропластов адаптация растения к низким температурам происходит частичная деградация гранальных структур и полное исчезновение крахмальных зерен. На уровне других мембранных структур такая адаптация ведет к увеличению общей площади мембран и появлению многочисленных инвагинаций и складок, а также к уменьшению плотности расположения белковых частиц в плоскости липидного бислоя. На молекулярном уровне происходит активация гидролитических ферментов (амилазы, десатуразы), а также ферментов антиоксидантного цикла. При адаптации растений к низким температурам происходит уменьшение размеров вакуоли и увеличение размеров цитоплазмы, растет число и размеры органелл и других цитоплазматических включений, а также происходит деполимеризация цитоскелета. На организменном уровне стратегия выживания растительного организма при низких температурах реализуется путем

поглощение тепла из окружающей среды, теплопродукции при замерзании воды и метаболического обогрева.

Фотосинтетический аппарат является основным поставщиком энергии для всех синтетических процессов фотоавтотрофного организма. В благоприятных условиях в клетках водорослей накапливаются значительные резервы органических веществ, обеспечивающих переживание организма за счет дыхания в условиях, когда фотосинтез невозможен. Однако в неблагоприятных условиях клетки водорослей используют все ресурсы для сохранения функциональной активности фотосинтетического аппарата, так как только фотосинтез способен обеспечить клетку необходимыми энергетическими эквивалентами для дальнейшей жизнедеятельности и воспроизводства при наступлении благоприятных условий. Видимо, метаболизм клеток водорослей, способных длительно время переживать зимние холода и сумрак, направлен на сохранение хотя бы части своего фотосинтетического аппарата, без которого восстановление жизненно важных процессов невозможно. При длительном пребывании в неблагоприятных для роста условиях водоросли претерпевают значительные морфологические изменения. При этом может происходить потеря части структур и пигментов фотосинтетического аппарата. Часть клеток, не потерявших функциональной активности фотосинтетического аппарата, получают возможность для роста и деления, как только сложатся благоприятные условия.

Поэтому состояние фотосинтетического аппарата водорослей может быть использовано в качестве критерия их способности к дальнейшему росту и развитию.

2.3. Энергетическая стоимость физиологических процессов

Практически любой физиологический процесс требует затрат энергии. Изменения физиологического состояния организма оказывают влияние на интенсивность его энергетического обмена. Энергетические затраты организма для реализации одного и того же процесса в неблагоприятных условиях выше затрат энергии в оптимальной для жизни среде. В разных условиях в организме могут изменяться концентрации субстратов и продуктов реакции, что ведет к изменению затрат энергии, необходимой для протекания этой реакции. Энергия, необходимая для протекания реакции определяется свободной энергией Гиббса – ΔG . Например, ΔG для процесса фосфорилирования в ФСА после темновой адаптации, когда концентрации АДФ и фосфатов (Ф) достигают 10 мМ, а – АТФ составляет 1 мМ, соответствует:

$$\Delta G_T = \Delta G_o + RT \ln(\text{АДФ}/\text{АДФ} \cdot \text{Ф}) = -31 + RT \ln(10^{-1}/10^{-2} \cdot 10^{-2}) = -37 \text{ кДж/моль}$$

При длительном пребывании на свету в процессе фотосинтеза концентрации АДФ и Ф снижаются до 1 мМ, а – АТФ достигает 10 мМ.

При этом $\Delta G_c = \Delta G_o + RT \ln(\text{АДФ}/\text{АДФ} \cdot \text{Ф}) = -31 + RT \ln(10^{-2}/10^{-3} \cdot 10^{-3}) = -54 \text{ кДж/моль}$.

Таким образом, в приведенном примере необходимые затраты энергии для фосфорилирования в условиях длительного освещения ФСА почти на 40% превосходят затраты энергии на этот же процесс, если он проходит после длительной адаптации растения в темноте. Общим правилом является, что в условиях снижения концентраций субстратов и увеличения концентрации продукта энергия, необходимая для протекания реакции, существенно возрастает.

Неблагоприятное воздействие каких-либо факторов может быть скомпенсировано перестройкой метаболизма, что требует дополнительных затрат энергии. Таким образом, состояние организма может быть охарактеризовано суммарной энергией, затраченной на поддержание какого-либо жизненно важного процесса в пределах физиологической нормы. Такой критерий пригоден для оценок качества среды его обитания и может иметь количественное выражение. Для количественного определения качества среды надо сопоставить затраты энергии организмом в данных условиях среды с *энергетическим ресурсом адаптации организма*. Последний показатель является разностью между максимальной энергией, которую способен затратить организм, и минимальной энергией затрачиваемой организмом в оптимальных условиях.

Биоэнергетический подход позволяет определить неиспользованный ресурс адаптации и предсказать пределы усугубления неблагоприятных факторов, не вызывающих летальных исходов. Зависимость энергетических затрат организма от многих факторов среды (температуры, солености, pH и др.) имеет параболический характер (рис). Многими исследованиями показано совпадение минимальной энергетической стоимости роста организма с его максимальной выживаемостью. В случае загрязнения среды токсическими веществами следует считать, что их оптимальная концентрация равна нулю. В связи с этим зависимость энергетических затрат организма от концентрации токсического вещества описывается правой ветвью параболы.

2.4. Стресс

Понятие стресса можно отнести к одной из базовых научных категорий. В самом общем виде его можно определить как естественную приспособительную реакцию живого организма на какое-либо возмущение в окружающей среде, превосходящее определенный порог. Впервые представления об общем адаптационном синдроме, обозначаемый позже как «стресс» (*stress – давление, нажим, напряжение), сформулировал Г.Селье в 1936 году. Он обратил внимание на то, что многие заболевания сопровождаются общими симптомами. По мнению Селье «Стресс есть органическое, физиологическое, нервно-психическое расстройство, а именно нарушение обмена веществ, вызванное раздражающими факторами». Многолетние исследования Селье и его последователей показали, что стресс является неспецифическим сопровождением множества болезней. В ранних работах Селье рассматривал стресс как негативное для организма явление, но

позже он пришел к заключению, что стресс возникает при необходимости перестройки независимо от складывающейся ситуации, благоприятной или неблагоприятной. Таким образом, стресс является неспецифической ответной реакцией организма на любое предъявляемое ему требование, превосходящее определенный уровень. Стресс не всегда результат повреждения. Стресс – не зло и не болезнь, хотя в крайних проявлениях может привести к ним. Стресс является одним из важнейших механизмов адаптации, позволяющих организму преодолеть неблагоприятные ситуации. Селье писал: «несущественно, приятен стрессор или неприятен. Его стрессорный эффект зависит только от интенсивности требований к приспособительной способности организма. Любая нормальная деятельность - игра в шахматы и даже страстное объятие - может вызвать значительный стресс, не причинив никакого вреда. Вредоносный или неприятный стресс следует называть "дистресс"». (*distress - горе, несчастье, недомогание, истощение, нужда). Исходно термин стресс был принят в отношении человека и широко использовался в психологии, затем он был распространен на животных, а позже и на растительные объекты и одноклеточные организмы.

Изменение состояния организма при достижении границы зоны толерантности могут реализоваться в соответствии с двумя стратегиями выживания: анабиозом или стрессом. Закономерное поведение клетки на границе толерантности при переходе в новое, резервное состояние с повышенной резистентностью к действующему фактору за счет медленных адаптивных перестроек принято считать «стрессом» на клеточном уровне [Г.Селье, 1936].

Термин стресс в последнее время вошел в описание множества ситуаций. Исходно в переносном смысле говорили о стрессе в стране, экономике, общественном сознании и т.д. Сейчас под стрессом часто понимают любое неблагоприятное воздействие и часто такое, которое правильнее было бы назвать дистрессом.

Стрессом в прямом, а не в переносном смысле, следует считать генетически обусловленный неспецифический синдром адаптации, приводящий к повышению устойчивости организма. На [рис.](#) представлена зависимость метаболизма, устойчивости и чувствительности организма от дозы фактора, способного вызывать стресс. Стресс происходит в условиях, когда внешние факторы среды выходят за границы толерантности. В границах толерантности организм поддерживает гомеостаз. При этом уровень метаболизма (синтез белков и другие синтезы, продукция энергетических эквивалентов др.) поддерживаются на постоянном уровне. Также на постоянном уровне остается устойчивость и чувствительность (изменение какого-либо признака или показателя функциональной активности организма на действия малого внешнего фактора).

Стресс у человека и животных на нервно-гуморальном уровне достаточно подробно описан в обширной медицинской литературе по патофизиологии. Реакции растительных организмов на стресс исследованы в меньшей степени. Этапы развития стресса включают стадии тревоги, адаптации и истощения. Первая стадия стресса соответствует выходу организма из зоны толерантности и приводит к снижению общего уровня метаболизма. При этом на этой стадии стресса у растительных организмов усиливается катаболизм липидов и биополимеров. Кроме того, в результате катаболизма образуются фитогормоны, которые приводят к усилению синтеза специфических (шоковых) соединений и повышению устойчивости клеток. Шоковые белки синтезируются в клетках в ответ на различные воздействия: анаэробизм, окислительное повреждение, повышение и понижение температуры, обезвоживание, высокие концентрации солей, действие тяжелых металлов, ультрафиолетовое облучение, раневые повреждения, внедрение вредителей и др. Каждый из перечисленных факторов вызывает синтез специфических белков. Вместе с тем ряд шоковых белков образуется при разных стрессовых воздействиях. В связи с этим часто наблюдается «перекрестное» повышение устойчивости растений, когда в ответ на стрессовое воздействие одного фактора повышается устойчивость к другому воздействию. Так, нагрев до температур, вызывающих стресс, приводит к повышению устойчивости растительного организма в отношении нагрева за счет образования шоковых белков. При этом повышается устойчивость растения и к некоторым другим факторам, например, к действию кадмия, а кадмий приводит к повышению устойчивости в отношении действия высоких температур. Следует отметить, что многие воздействия сопровождаются усилением синтеза ферментов, участвующих в защите клетки от окислительного повреждения активными формами кислорода.

К шоковым белкам относится также убиквитин – белок, присоединение которого к N-концу полипептида делает данный полипептид мишенью для разрушения протеазами. При помощи этой метки происходит выбраковка поврежденных, функционально неактивных полипептидов, подлежащих уничтожению. Таким образом, поврежденные белки подвергаются протеолизу и пополняют запасы аминокислот в клетке.

Мембраны как естественный барьер первыми подвергаются действию стрессовых факторов. Они представляют собой мишени первичного воздействия и первую линию защиты от него. Мембрана способна быстро изменять свои свойства в ответ на внешние воздействия и запускать каскад изменений метаболизма клетки. Как правило, стрессовые воздействия приводят к повышению проницаемости мембран, деполяризации плазмолеммы и подкислению цитоплазмы. При этом возрастает активность H^+ -помпы в плазмалемме и тонопласте, повышается вязкость цитоплазмы. В цитозоле концентрация ионов кальция 10^{-5} - $10^{-8}M$, в то время как в апопласте и органеллах приблизительно в 1000 раз выше. При стрессовых воздействиях и деструктивных изменениях мембран кальций из апопласта поступает в цитоплазму. Это

приводит к открытию специфических мембранных каналов и может вызвать структурные изменения в клетке.

Стресс от разных действующих факторов могут вызывать специфические ответы, особенно в тех случаях, когда действующий фактор имеет биологическую природу. В случае действия патогенов может происходить сильное повышение чувствительности и снижение устойчивости клеток вокруг места внедрения патогена, которое вызывает гибель клеток и предотвращает дальнейшее распространение инфекции организма (реакция сверхчувствительности). Такие реакции сопровождаются усиленной генерацией активных форм кислорода.

Часто можно наблюдать «перекрестную устойчивость», когда вызывающий стресс фактор имеет одну природу, например, высокотемпературный стресс, а происходит повышение устойчивости организма не только к высоким температурам, но и к токсическим агентам химической природы, или наоборот. Так стресс от действия кадмия на растения приводит к повышению устойчивости к действию высоких температур. Изучение механизмов адаптации может дать возможность управлять этим процессом или определять условия достижения пределов адаптации. Одной из задач экологической биофизики является выяснение физико-химических механизмов адаптации.

Как правило, в случае неспецифического воздействия в зоне стресса организм имеет повышенную устойчивость и сниженную чувствительность на фоне низкого уровня метаболизма. Стресс - это генетически запрограммированное состояние ожидания опасности (переход в бомбоубежище, где менее удобно, но более безопасно). Со временем организм может вернуться в исходное состояние или перейти в новое состояние, больше соответствующее внешним условиям. Если доза воздействия достигнет летального уровня, организм погибает. При этом на границе летальной дозы резко повышается чувствительность и падает устойчивость. Интересно отметить, что в диапазонах доз, соответствующих переходам из зоны толерантности к стрессу и от стресса в летальную зону, экспериментальные данные могут иметь большой разброс (высокое значение среднеквадратичного отклонения для измеряемого признака). Соответственно, большое значение среднеквадратичного отклонения может указывать на достижение дозы воздействия, соответствующей переходу к стрессу или в летальную зону. В этих случаях при исследовании воздействий стрессовых факторов на популяцию наблюдается повышение неоднородности ответной реакции отдельных особей. Это обеспечивает большее разнообразие возможностей выживания популяции при изменении условий среды.

3. Влияние фоновых воздействий на биологические системы

3.1. Фоновые воздействия.

Слабые фоновые воздействия - это физические и химические воздействия, не превосходящие по интенсивности фоновые значения, характерные для условий обитания организма в отсутствии антропогенных воздействий. Такие воздействия могут быть и не малыми по абсолютной величине, но они постоянно или длительное время присутствуют в среде обитания. Биологический объект в ходе эволюции формировался при этих воздействиях и, естественно, адаптирован к ним. Тем не менее, множеством экспериментов и наблюдений установлены факты влияния слабых фоновых воздействий на биологические системы. В ряде случаев механизмы такого влияния в основном установлены. Однако в отношении механизма действия большинства слабых фоновых воздействий ведутся непрекращающиеся дискуссии.

Практически невозможно контролировать содержание какого-либо вещества в природных средах в концентрациях ниже 10^{-16} М. Не вызывает сомнения, что с загрязнениями такого уровня мы сталкиваемся систематически. В настоящее время трудно оценить возможные последствия действия сверхмалых доз биологически активных веществ и физических факторов на биосферу. В принципе, эта проблема давно привлекает внимание экологов и специалистов в области растениеводства. Хорошо известно явление *аллелопатии* – взаимодействия растений посредством выделения во внешнюю среду биологически активных веществ (фитонцидов, фенолов, антибиотиков и др.). Таким образом, одна популяция может продуцировать вещества, вредные для конкурирующей популяции или напротив, способствовать поддержанию устойчивых сообществ. Аллелопатия является одним из фундаментальных экологических процессов. Она играет важную роль в формировании и развитии растительных группировок. Растения с высокой аллелопатической активностью (пырей, ясень, лох, черный орех и др.) легко внедряются в сообщество, подавляют другие виды, но вызывают при этом почвоутомление и не могут быть доминантами. Интересно отметить, что некоторые вещества, ответственные за аллелопатический эффект, такие как стригол (один из вторичных метаболитов пырея), проявляют свою активность в концентрациях порядка 10^{-16} М.

В стабильных экосистемах естественный отбор стремится уменьшить отрицательное влияние взаимодействующих популяций. Если же контакт между популяциями возник недавно, между ними наблюдаются наиболее тяжелые разрушительные взаимодействия (Ю.Одум). Поэтому одной из причин экологических бедствий могут быть виды вселенцы, чужеродные данной экосистеме.

В водных экосистемах аллелопатические эффекты, видимо должны иметь не меньшее значение, чем у наземных растений. По мнению К.М.Хайлова (1971), видимо, правильно говорить о «биохимии водных сообществ». Растворенное органическое вещество в большышней степени определяет состав и состояние биоты в водной среде. Масса растворенного органического вещества многократно превосходит массу всех

организмов мирового океана. Основным поставщиком растворенного органического вещества является фитопланктон, клетки которого выделяют в среду значительную часть производимого органического вещества, как в ходе нормальной жизнедеятельности, так и при отмирании. В состав веществ, выделяемых фитопланктонными организмами, могут входить и токсины. Широко известны токсичные приливы, вызванные массовым развитием микроводорослей, главным образом, динофлагеллат. Около 60 видов динофлагеллат образуют водо- и жирорастворимые токсины цитолитического, гепатотоксического или нейротоксического действия. В последнее время описаны крайние проявления массового цветения токсичных водорослей и цианобактерий, вызывающих отравления животных и людей.

Видимо, присутствие в воде биогенных токсических веществ может играть важную роль в формировании всей водной биоты. При этом эффекты сверхмалых доз биологически активных веществ могут играть чрезвычайно большое значение. Но тогда подходы к оценке состояния среды с позиций предельно допустимых концентраций токсических веществ выглядят несостоятельными. Видимо, для таких оценок целесообразно использовать биоиндикацию и биотестирование, которые более адекватно отражают состояние среды по самочувствию биологического объекта в ней.

3.2. Действие на организм сверхмалых доз биологически активных веществ.

Под сверхмалыми дозами понимают такие дозы биологически активных веществ, эффект действия которых необъясним с традиционных позиций и требует для своего объяснения привлечения новых механизмов. Это обусловлено тем, что эффективно действующим количеством биологически активного вещества в расчете на клетку составляет всего от 1 до 10 молекул. Для действия сверхмалых доз типичной являются немонотонная зависимость эффекта от дозы, когда максимумы активности разделены зонами нечувствительными к воздействию. Для действия физических факторов эффект может усиливаться с понижением интенсивности воздействия. Кроме того, эффект действия сверхмалых доз чрезвычайно чувствителен к действию на объект разнообразных внешних и внутренних факторов.

На протяжении последней четверти века было проведено большое количество экспериментов, направленных на исследование действия малых доз биологически активных веществ на различные биологические объекты. Эти исследования выполнены в солидных лабораториях чрезвычайно авторитетными учеными, а результаты опубликованы в рецензируемой литературе и не вызывают сомнений в достоверности. Наиболее плодотворно исследования действия сверхмалых доз биологически активных веществ были проведены под руководством Е.Б.Бурлаковой.

Как правило, зависимость биологического эффекта от концентрации вещества, способного вызывать реакцию организма в сверхмалых дозах, имеют два (реже три) максимума. В интервале концентраций между этими максимумами биологические эффекты практически не проявляются (рис.). Причем биологические эффекты влияния сверхмалых доз обычно превосходит действие высоких концентраций тех же веществ. Таким образом, происходит повышение чувствительности различных биологических объектов к действию ряда факторов при использовании их в сверхмалых дозах по сравнению с «обычными» дозами того же фактора. Например, такие эффекты обнаружены на растениях при действии на них гербицидов, а также на животных и человеке при действии на них противоопухолевых препаратов. Описаны эффекты действия сверхмалых доз на свойства мембран эритроцитов и активность некоторых ферментных систем. Детальные исследования влияния токоферола на активность протеинкиназы-С показало, что ингибирующее действие α -токоферола проявляется в диапазонах концентраций 10^{-16} - 10^{-12} и 10^{-4} - 10^{-5} М. При этом в концентрациях от 10^{-6} до 10^{-12} М α -токоферол не ингибирует протеинкиназу. Аналогичные эффекты показаны и для ряда других ферментов и ингибиторов.

Механизм действия на макромолекулы сверхмалых доз биологически активных веществ (в концентрациях порядка 10^{-16} М) не ясен. Он не укладывается в представления теории действующих масс. В связи с этим Л.А.Блюменфельд выдвигал гипотезу о параметрическом резонансе – совпадении временных параметров запускаемых действующим веществом процессов и временем взаимодействия этого вещества с мишенью. Е.Б.Бурлаковой было высказано предположение о том, что мишень (рецептор) может содержать несколько центров с разной активностью. При низких дозах биологически активного вещества оно взаимодействует с более активными центрами мишени, а с ростом дозы взаимодействие распространяется на менее активный центр. С ростом дозы активного вещества происходят такие изменения мишени, при которых более активные центры освобождаются от биологически активного вещества. Возможно, именно таким образом обонятельный рецептор отвечает на изменение дозы пахучего вещества.

Биологическое действие малых доз ионизирующей радиации проявляет признаки, типичные для действия сверхмалых доз биологически активных веществ. По мнению ряда авторов, немонотонная зависимость эффекта от дозы радиации обусловлена повреждением объекта и активацией систем его восстановления. Эффект от действия ионизирующей радиации нарастает с увеличением дозы, а затем снижается в связи с активацией систем восстановления. Дальнейший рост дозы радиации увеличивает эффект повреждения, которое уже не может быть скомпенсировано системой восстановления.

Эффекты действия на организмы сверхмалых доз биологически активных веществ установлены во многих исследованиях. При этом механизм такого действия остается не ясным. Многие авторы пытаются объяснить эффект сверхмалых доз биологически активных веществ их влиянием на структурные характеристики воды. Но надежных экспериментальных подтверждений эти предположения не имеют.

Несмотря на то, что механизм действия сверхмалых доз биологически активных веществ в настоящее время остается не выясненным, в медицине уже используются препараты в сверхмалых дозах (адгелон, феназепам).

**Адгелон - глазные капли, которые стимулируют репаративные процессы в роговице глаза, способствуя активации фибробластических элементов, препятствуют развитию воспалительного процесса, разрастанию рубцовой ткани, врастанию сосудов в роговицу. Феназепам назначают при различных невротических, неврозоподобных, психопатических и психопатоподобных состояниях, сопровождающихся тревогой, страхом, повышенной раздражительностью, эмоциональной лабильностью.*

3.3. Действие электромагнитных полей на биологические системы.

Данная тема детально рассмотрена в двух учебных пособиях: Ю.Б.Кудряшов и др. 2008, «Радиационная биофизика: радиочастотные и микроволновые электромагнитные излучения» и Ю.Б.Кудряшов, А.Б.Рубин 2014, «Радиационная биофизика: сверхнизкочастотные электромагнитные излучения».

Земля подвержена действию электромагнитных полей от источников земного и внеземного происхождения. Множество исследований было направлено на выяснение влияния электромагнитных полей на биологические системы. Установлено, что электрические и магнитные поля являются важными факторами, оказывающими влияние на состояние всех биологических объектов в зоне их действия.

Интенсивность электромагнитных излучений (ЭМИ) Солнца и других внеземных источников в радиочастотном и микроволновом диапазонах находятся в пределах от 10^{-24} Вт/м² в условиях «спокойного Солнца» до 10^{-12} Вт/м² при максимумах солнечной активности. Предельно допустимые интенсивности ЭМИ в разных странах находятся в пределах от 10 до 10^{-1} Вт/м². Такие интенсивности ЭМИ достигнуты во многих мегаполисах мира и, видимо, тенденция к повышению интенсивности ЭМИ сохранится в ближайшем будущем. В этих условиях необходимо иметь объективные знания о рисках от действия ЭМИ для здоровья человека и состояния биосферы. Исследования, направленные на выяснение биологических эффектов ЭМИ, были начаты в 20-е годы прошлого века и, видимо, будут продолжаться еще долгое время.

Исследования биологического действия электромагнитных полей промышленной частоты, выполненные в СССР в 60-70х годах, ориентировались в основном на действие электрической составляющей, поскольку экспериментальным путем значимого биологического действия магнитной составляющей поля обнаружено не было. В 70-х годах были введены нормативы по предельным интенсивностям электромагнитных полей, которые являются одними из наиболее жестких в мире. Они изложены в Санитарных нормах и правилах "Защита населения от воздействия электрического поля, создаваемого воздушными линиями электропередачи переменного тока промышленной частоты" № 2971-84. Несмотря на то, что магнитное поле во всем мире сейчас считается наиболее опасным для здоровья, предельно допустимая величина магнитного поля для населения в России не нормируется. На основании массовых эпидемиологических обследований населения, проживающего в условиях облучения магнитными полями высоковольтных линий электропередач как безопасный или "нормальный" уровень для условий продолжительного облучения, не приводящий к онкологическим заболеваниям, независимо друг от друга шведскими и американскими специалистами рекомендована максимальная допустимая величина плотности потока магнитной индукции 0,2 - 0,3 мкТл. В настоящее время стандарты безопасного уровня электромагнитных полей в разных странах различаются в десятки раз, что свидетельствует о недостатке знаний в этой области.

Зависимость затухания электромагнитных полей (ЭМП) в биологических тканях имеет сложный характер. С ростом частот радиоволн глубина проникновения излучения сильно понижается. Уменьшение амплитуды ЭМП в $e(2,72)$ раз характеризует глубину проникновения излучения в материал (биологическую ткань). При длине волны 10 см в мышечную ткань глубина проникновения 15 см. При 8 мм – 0,3 мм.

Действие ЭМП на биологические объекты принято разделять на энергетическое (тепловое) и нетепловое воздействие, которое некоторые авторы называют информационным. Тепловое воздействие ЭМП используется для создания гипертермии (нагреве локальных участков тканей до 42-45 °C). Вредными принято считать ЭМП в любом диапазоне частот с плотностью мощности, превышающей 10 милливатт на 1 см². При относительно низкой мощности электромагнитных полей (менее 1 мВт/см²) принято говорить о нетепловом или информационном характере их воздействия на организм.

Если, механизм теплового действия ЭМИ высокой интенсивности в основном понятен, механизм действия ЭМИ, не вызывающие нагрева, но оказывающие влияние на функциональное состояние биологических объектов до настоящего времени остается не ясным. Проблема первичных механизмов «информационного» действия ЭМИ на биологические объекты представляется чрезвычайно сложной. Эффекты нетеплового действия наблюдали при плотности потока энергии ЭМИ менее 1 мВт/см² в радиочастотном и микроволновом диапазонах (300 МГц – 300 ГГц). Порог чувствительности действия ЭМИ составляет около 10^{-12} Вт/м². Наибольшие эффекты действия ЭМИ обычно находятся в диапазоне от 10^{-7} до 10^{-6} Вт/м². Изменения состояния организм не находится в прямой зависимости от интенсивности ЭМИ.

По одной из гипотез, организм воспринимает ЭМИ малых интенсивностей аналогично тому, как он реагирует на изменения многих других факторов среды (температуры, освещенности и т.п.). Реакция

организма в ответ на действие ЭМИ сводится к адаптации к изменившимся условиям среды. Выделяют три типа действия ЭМИ на организм: сигнальное, регулирующее и дестабилизирующее.

Сигнальное действие реализуется при интенсивностях ЭМИ, близких к естественным источникам излучения. Такое действие воспринимается организмом как информация и реализуется в поведенческих реакциях для пространственной и временной ориентации. У человека оно проявляется в различных субъективных ощущениях. Сигнальное действие ЭМИ имеет триггерный характер и проявляется после достижения пороговой интенсивности. Регулирующее действие вызывает изменение функционального состояния организма. Величина ответной реакции, как правило, не велика и обратима. Дестабилизирующее действие проявляется в увеличении отклонений от средних значений (дисперсии) множества измеряемых параметров, характеризующих состояние организма. Регулирующее и дестабилизирующее действие ЭМИ по сути отражают разные стороны одного процесса.

Все вышесказанное относится к действию на биологические объекты ЭМИ в диапазоне частот 300 МГц – 300 ГГц. Влияние на биологические объекты сверхнизкочастотных электромагнитных полей с частотами от 0 до 100 или 300 кГц принципиально отличается от действия ЭМИ высокочастотного диапазона. Эти отличия обусловлены большой длиной волны ЭМИ сверхнизкочастотного диапазона (порядка километров) по сравнению с размерами биологических объектов. В связи этим при анализе действия сверхнизкочастотных полей производится измерение электрической и магнитной составляющих поля раздельно. Внешние электрические и магнитные возмущения от действия сверхнизких частот ЭМИ наводят в организме электрические поля и токи. Такие поля могут стимулировать нервные и мышечные ткани. Биологический объект может сильно изменить конфигурацию электрического поля. Магнитные поля в биологических тканях не испытывают сколько-нибудь значительных изменений.

У человека не обнаружено специальных рецепторов на действие сверхнизкочастотных ЭМИ. Тем не менее, слабые поля способны вызывать выработку рефлексов и поведенческие реакции. В ряде экспериментов на животных были выявлены морфологические изменения нарушения различных органов и тканей под действием электрических полей с частотами 6 и 50 Гц. Однако, действие сверхнизкочастотных ЭМИ различных интенсивностей и продолжительностей, как правило, обратимо и не приводит к катастрофическим последствиям. Наиболее сильно выражены реакции на сверхнизкочастотных ЭМИ у птиц, особенно перелетных. Многие водные животные используют сверхнизкочастотные электрические поля для ориентации и поиска пищи. Видимо, сенсором этих излучений у рыб является «боковая линия». У акул и ряда других рыб имеется специальный орган – ампула Лоренцини. Этот орган обладает уникальной чувствительностью к сверхнизкочастотным электрическим полям и обеспечивает успешность в поисках пищи – рыб генерирующих слабые электрические поля. В последние годы накоплено много фактов действия магнитного поля Земли и сверхнизкочастотных полей на поведение насекомых. Пчелы в отсутствие других источников информации для ориентации используют суточные вариации магнитного поля Земли. Вблизи высоковольтных линий электропередач, создающих сверхнизкочастотные ЭМИ, пчелы становятся более беспокойными, агрессивными, снижается их работоспособность и продуктивность. В экспериментах на проростках растений достоверно показана сложная многофазная зависимость скорости прорастания от интенсивности сверхнизкочастотного поля, в которой скорость прорастания возросла и понижалась более, чем на 20%. Известны данные о нарушениях ряда биохимических процессов у растений и микроорганизмов под действием сверхнизкочастотных полей.

Таким образом, сверхнизкочастотные ЭМИ вызывают многочисленные изменения биологических объектов на всех уровнях их организации. Действие сверхнизкочастотных ЭМИ может как стимулировать, так и угнетать ряд физиологических функций организма. Ответную реакцию организма на сверхнизкочастотные ЭМИ, видимо, следует рассматривать как стрессорную.

Основная трудность в объяснении механизма действия ЭМИ заключается в том, что энергия кванта электромагнитного излучения с длиной волны 1 мм около $1.2 \cdot 10^{-3}$ эВ. При комнатной температуре $kT = 2.5 \cdot 10^{-2}$ эВ. Энергия колебательных уровней молекул лежат в диапазоне от 10^{-1} до 10^{-2} эВ, а вращательных от 10^{-3} до 10^{-4} эВ. С увеличением длины волны электромагнитного поля энергии теплового фактора kT еще более превосходит энергию кванта излучения. Этим обстоятельством определяются главные затруднения в описании механизма влияния электромагнитных полей на биологические системы. Часто сложность объяснения механизма действия электромагнитных полей на биологические системы называют «проблемой kT ».

Очевидно, что электромагнитные излучения могут взаимодействовать в организме с частицами, имеющими заряд, а также электрический или магнитный дипольный момент. Экспериментально обнаружены амплитудно-частотные окна, внутри которых биологические эффекты действия электромагнитного излучения проявляются наиболее сильно. Рядом авторов было установлено, что биологически активные частоты электромагнитного излучения соответствуют циклотронным частотам некоторых ионов. Циклотронная частота или гиромангнитная частота – это частота периодического движения заряженной частицы в плоскости перпендикулярной вектору напряженности постоянного магнитного поля. Циклотронная частота иона равна:

$\Omega = qH/mc$, где q и m – заряд и масса иона, а H и c – напряженность постоянного магнитного поля и скорость света.

Поскольку организмы находятся под постоянным действием геомагнитного поля, то чаще всего в экспериментах рассматривают совместное действие постоянного и переменного магнитных полей с различной ориентацией относительно друг друга. Взаимная ориентация постоянного и переменного полей имеет большое влияние на ответную реакцию организма. Характерное время наступления биологических эффектов от начала воздействия составляет более 10 минут, что указывает на опосредованное действие слабых магнитных полей на биологические объекты. Видимо, электромагнитное поле действует на ионы или диполи, которые запускают каскад изменений состояния организма. Ряд экспериментов показал, наличие биологических эффектов на циклотронной частоте ионов кальция, магния, натрия, некоторых аминокислот и других ионизированных молекул. Высказаны предположения о возможной роли в наблюдаемых эффектах действия магнитных полей на биологические объекты активных форм кислорода и других свободных радикалов, обладающих ненулевым собственным магнитным моментом.

В настоящее время можно считать установленным, что биологический отклик на электромагнитные излучения имеет полиэкстремальный вид. Существуют как частотные, так и амплитудные окна, в которых обнаруживаются биологические эффекты. Максимальные эффекты обнаруживаются на циклотронных частотах некоторых биологически активных ионов.

По мнению А.С.Пресмана: «... характер реакции организмов на ЭМП зависит не от величины электромагнитной энергии, поглощенной в тканях, а от модуляционно-временных параметров электромагнитных полей, от того, на какие именно системы организма осуществлялось воздействие при прочих равных условиях. Величина той или иной реакции не только не пропорциональна интенсивности воздействия ЭМП, но наоборот, в ряде случаев уменьшалась по мере возрастания интенсивности. А некоторые реакции не возникали при высоких интенсивностях».

Не вызывает сомнения, что выяснение механизма нетеплового действия ЭМИ на биологические системы различных уровней организации и человека остается одной из актуальных проблем современной биологии. Эта проблема все более обостряется в условиях непрерывно нарастающего загрязнения среды ЭМИ, которые производят различные технические средства.

3.4. Влияние солнечной активности и магнитного поля Земли на биологические системы.

Солнечная активность оказывает большое влияние на биологические системы. Под солнечной активностью понимают совокупность изменяющихся структур (пятен, факелов, вспышек, протуберанцев и др.) в некоторых ограниченных областях солнечной атмосферы. Во всех процессах солнечной активности фундаментальную роль играют магнитные поля. Появление структур на Солнце обусловлено локальным усилением магнитного поля с 10-20 до нескольких тысяч эрстед. В простейшем варианте солнечного пятна можно представить себе как погруженный в фотосферу подковообразный магнит с двумя полюсами. Магниты располагаются вдоль параллелей Солнца так, что при его осевом вращении пятна смещаются по видимой части солнечного диска. Средний период смещения солнечных пятен 27,275 суток. Магнитное поле, формируемое вращением Солнца, имеет довольно устойчивую секторную структуру. Каждые 11 лет полярность пятен меняет знак на противоположный. С учетом смены полярности полный цикл солнечной активности составляет 11 лет + 11 лет = 22 года. Таким образом, напряженность магнитного поля Солнца сильно варьирует во времени, имеет ряд периодов и аperiodических изменений, причины которых вызывают споры в научном сообществе.

В качестве показателя солнечной активности принято использовать число Вольфа, которое равно $W = 10g + f$, где f - число одиночных пятен и g - число групп пятен. Номер 11-летнего цикла солнечной активности принято отсчитывать с 1749 года. На рис. 11 представлены профили числа Вольфа на протяжении последних 3 циклов солнечной активности. Кроме того, в качестве меры обобщенного уровня солнечной активности используют поток солнечного радиоизлучения на определенных длинах волн. Разработано много различных индексов магнитной активности Солнца и степени его влияния на геомагнитное поле.

Вспышки на Солнце сопровождаются электромагнитным излучением в различных областях спектра, а также потоками электронов, протонов и α -частиц. Типичные энергии излучений от солнечной вспышки:

гамма $\lambda < 0,01$ нм 10^{25} эрг

λ в диапазоне 0,01 - 10 нм 10^{25} эрг

λ в диапазоне 10 - 300 нм 10^{30} эрг

в видимом диапазоне 10^{26} - 10^{31} эрг

в радиочастотном диапазоне 10^{22} - 10^{24} эрг.

Поток электронов с энергией > 20 КэВ и протонов с энергией > 20 МэВ составляют 10^{27} - 10^{31} и около 10^{31} соответственно.

Земля обладает собственным магнитным моментом $8,1 \cdot 10^{25}$ Гс·см³. Для создания потока магнитной индукции, которым обладает Земля, по охватывающему ее по экватору проводнику надо было бы пропустить ток 600 миллионов ампер. Взаимодействие магнитного поля Земли с солнечным ветром создает сложную структуру магнитосферы нашей планеты.

Ряд природных явлений обусловлено солнечным ветром – потоком заряженных частиц от Солнца. Расстояние от Солнца до Земли солнечный ветер при средней скорости потока плазмы - 400 км/сек

преодолевают за 4,5 суток. Взаимодействие солнечного ветра с магнитным полем Земли приводит к магнитным бурям и полярным сияниям, а также является источником радиоволн с частотами 10^2 – 10^3 кГц. Вклад солнечного ветра в напряженность магнитного поля Земли не превосходит 10% постоянного поля планеты.

Солнечная активность влияет на земную погоду и климат. Установлена зависимость тропосферной циркуляции Земли от магнитных бурь. В настоящее время нет общепринятых представлений о механизме воздействия солнечной активности на тропосферную циркуляцию. Одна из гипотез состоит в том, что образование облаков сильно зависит от концентрации молекул ионизированных, за счет действия космических лучей галактического происхождения. Увеличение потока космических лучей приводит к увеличению облачности и большему отражению солнечной радиации в космическое пространство. В свою очередь интенсивность потока космических лучей модулируется солнечной активностью. Как известно, при снижении солнечной активности интенсивность потока космических лучей возрастает, а облачность увеличивается. Такая система связей может характеризоваться значительной нелинейностью, когда на мало изменившийся внешний фактор система откликается катастрофическими изменениями. Рассмотренная гипотеза о механизме влияния солнечной активности на погоду и климат не является единственной. Ограниченный объем данного пособия не позволяет рассмотреть множество гипотез, объясняющих это явление.

Для выяснения влияния солнечной активности на биологические объекты важным является твердо установленные факты связи процессов, протекающих на Солнце, с земной погодой. В частности, обнаружено, что пик индекса неустойчивости атмосферного давления наблюдается примерно через 3 суток после прохождения максимума развития магнитной бури.

Проблема воздействия солнечной активности на биосферу имеет достаточно продолжительную историю. В трудах А.Л.Чижевского в тридцатые годы XX века были высказаны соображения об изменениях медико-биологических показателей в больших регионах земного шара, синхронных с ходом солнечной активности. С той же закономерностью возникают эпидемии и изменения общей смертности населения земного шара, а также войн и революций за период от V века до первой четверти прошлого столетия. Некоторые другие биологические показатели (скорость роста деревьев, миграция рыб, массовое размножение микроорганизмов и др.) также свидетельствовали о существовании факторов воздействия, по-видимому, связанных со свойствами околоземного пространства в целом и процессами на Солнце, вызывающими глобальные изменения в биосфере.

Пристальное изучение, проведенное в 80-х годах, часто не выявляло достоверных корреляционных связей между активностью солнца изменениями в состоянии биологических объектов. Так, например, американскими специалистами были проведены статистические исследования за 4 года случаев смертности от коронарной недостаточности и инсультов головного мозга (275 млн. показателей). В этих исследованиях не были обнаружены статистически значимые корреляции медицинских и гелиогеофизических параметров, что способствовало возникновению серьезного скептицизма по отношению к данной проблеме. Недоверие вызывало и то, что не было выдвинуто убедительных теоретических концепций о механизмах воздействия слабых электромагнитных сигналов на биологические объекты.

В работе Т.К.Бреус (2003) убедительно описаны характерные особенности эффектов влияния геомагнитных возмущений на больных с патологией сердечно-сосудистой системы и на здоровых индивидуумов. В частности, было обнаружено наличие у 80% больных ишемической болезнью сердца и у 30% здоровых людей во время геомагнитных бурь изменений реологических свойств крови и капиллярного кровотока, таких как замедление капиллярного кровотока, агрегация эритроцитов, возрастание вязкости крови. Увеличение гормона кортизола и снижение продукции гормона эпифиза - мелатонина - в ответ на геомагнитное возмущение, как у здоровых, так и у больных людей. Наличие у людей, находящихся в условиях стресса адаптационной системы (42-х космонавтов) неспецифической и специфической реакций на воздействие геомагнитной бури. Неспецифическая реакция протекает по типу общего адаптационного синдрома, характерного для эффектов воздействия любых стрессорных факторов внешнего воздействия, таких, например, как физические нагрузки или психо-эмоциональные факторы. Изменения сердечного ритма как проявления общей функциональной реакции человеческого организма на воздействие геомагнитного возмущения, по-видимому, лежат в основе развития инфарктов миокарда и внезапной смерти. Геомагнитная буря оказывает слабые вегетативные влияния на регуляцию сердечного ритма и сосудистого тонуса у здоровых людей. Необратимые последствия подобных влияний могут наблюдаться только у больных, перенесших инфаркт миокарда и инсульты головного мозга, а также у группы людей, находящихся в состоянии значительного продолжительного стресса.

По мнению В.Е.Жвирблиса циклическая воспроизводимость результатов гелиобиологических наблюдений не только свидетельствует о реальности связей Солнце — биосфера, но одновременно указывает на нетривиальность этого феномена. Сложные, но вполне определенные частотно-фазовые соотношения между колебательными процессами в биосфере и магнитосфере — лишь следствие того, что с солнечным ветром одновременно распространяются два самостоятельных, но взаимозависимых космофизических фактора: «геоэффективный» и «биоэффективный». Первый логично отождествить с потоками частиц солнечного ветра, вызывающими возмущения в земной магнитосфере по известным

механизм; второй же может представлять собой лишь электромагнитные поля, генерируемые в плазме солнечного ветра. Эти электромагнитные поля влияют на все (или почти все) регуляторные системы живых организмов, т. е. неспецифичны. Вместе с тем на объекты, лишенные молекулярных регуляторных систем (т. е. на обычные объекты физики), он существенно не влияет.

Сцилла и Харибда гелиобиологии — биологическая индивидуальность объектов и циклическая воспроизводимость результатов наблюдений — чрезвычайно затрудняют изучение связей Солнце — биосфера. Однако эти трудности не должны восприниматься как свидетельство бесперспективности самого направления. Более того, обнаруженные закономерности могут иметь фундаментальное значение не только для биологии и медицины, но и для физики. Такие надежды оправдывают все самоотверженные усилия гелиобиологов, направленные на изучение механизмов влияния солнечной активности на биологические системы.

В последнее время развивается концепция «биогенного магнитита», которая объясняет чувствительность к изменениям геомагнитного поля многих организмов. Такая чувствительность объясняется присутствием в биологических тканях магнитных включений, которые накапливаются в виде ферромагнитных кристаллов Fe_3O_4 размерами от десятков до сотен нанометров. Выявлена локализация кристаллов магнитита у многих животных и человека. В головном мозге людей на 1 г ткани приходится не менее пяти миллионов кристаллов магнитита в мозжечке, базальных ганглиях и среднем мозге. У животных «биогенный магнитит» играет важную роль для навигации при сезонных миграциях. Видимо, у человека такие образования являются рудиментом и сейчас не имеют существенного значения. Тем не менее, можно предположить, что некоторые люди способны чувствовать направление и изменения магнитного поля. Несмотря на безусловный прогресс в исследованиях влияния магнитных полей на биологические объекты, эта проблема еще очень далека от своего решения.

3.5. Атмосферное электричество.

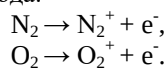
Источником ионизации атмосферы являются космические лучи, радиоактивные вещества Земли, УФ и корпускулярное излучение Солнца. В «хорошую погоду» напряженность электрического поля у поверхности земли составляет около 130 В/м. Атмосфера по отношению к земле заряжена положительно. Земля обладает отрицательным зарядом около $3 \cdot 10^5$ кулон. Наибольшая напряженность поля достигается в средних широтах.

Пробивное напряжение сухого воздуха 30 кВ/см и на многих предметах могут накапливаться значительные заряды, приводящие к появлению электростатических полей очень большой напряженности. В некоторых работах приведены данные о том, что поля свыше 1000 В/см вызывают головную боль и повышенную утомляемость, но механизмы такого действия не обсуждаются. Обычная напряженность поля на биологических мембранах имеет значение порядка 100 000 В/см и может достигать 500 000 В/см для сопрягающих мембран. Возможно, некоторые эффекты действия полей порядка 1000 В/см могут оказывать влияние на межклеточные процессы. Разряды молний приводят к образованию озона, который является чрезвычайно токсичным газом. Озон отнесен к первому, самому высокому классу опасности вредных веществ. Максимальная разовая предельно допустимая концентрация в атмосферном воздухе 0,16 мг/м³. Другими возможностями влияния электростатических полей на биологические объекты может быть ионизация воздуха. В частности, большое влияние на биологические объекты могут оказывать супероксидные анион-радикалы.

3.6. Физиологическое действие аэроионов.

Аэроионы — это положительно и отрицательно заряженные ионы, присутствующие в воздухе. Они образуются в результате энергозависимых процессов ионизации газов. Аэроионы могут образовываться под действием электрических разрядов и ионизирующей радиации космического и земного происхождения. Начиная с 30-х годов XX века, были проведены исследования влияния аэроионов на человека и животных. Большую роль в этих исследованиях сыграл российский ученый А.Л.Чижевский. До недавнего времени данные о влиянии аэроионов на функциональное состояние организма вызвали скепсис в связи с их очень низкой концентрацией в атмосфере. В конце XX века исследованиями Н.И.Гольдштейна и ряда других исследователей было показано, что высокая биологическая активность аэроионов обусловлена не электрическим зарядом молекул, а свободно-радикальной природой супероксидного анион-радикала кислорода (O_2^-).

Одни из наиболее вероятных способов образования O_2^- в атмосфере является акцептирование на молекулярный кислород свободного электрона, который образуется в результате ионизации азота или кислорода:



При электрических разрядах может образовываться множество ионов в том числе и O_2^- , а также озон (O_3) и оксиды азота. «Запах грозы» — это запах озона и оксидов азота — вредных для организма продуктов, которые могут образоваться также при работе ряда технических устройств и горении.

Супероксидный анион-радикал кислорода не имеет запаха. При попадании в водную среду происходит дисмутация супероксидных анион-радикалов с образованием перекиси водорода.

Следует отметить, что биологическое действие оказывают супероксидные анион-радикалы кислорода в концентрациях от нескольких сотен до трех тысяч ионов на 1 см^3 воздуха. В том же объеме содержится $2,7 \cdot 10^{19}$ неионизированных молекул. Таким образом, биологическое действие оказывает концентрация O_2^- порядка одной молекулы на 10^{16} нейтральных частиц. Это аналогично действию сверхмалых доз биологически активных веществ, рассмотренному выше. Несмотря на чрезвычайно низкую концентрацию аэроионов, они вызывают мощное биологическое действие. В настоящее время установлено, что ингаляция O_2^- и/или, вводимая в полость носа раствор H_2O_2 в ничтожных дозах, снижает послеоперационные боли и усиливает действие анальгетиков. Аэроионы способны ослаблять неблагоприятное действие гиперкапнической гипоксии – избытка углекислого газа при недостатке кислорода, гипероксии и ряда других факторов.

В экспериментах на животных показано, что депривация (полное удаление из воздуха O_2^-) приводит к гибели мышей через 7-16 суток, а крыс через 10-23 суток. Гибели животных предшествовали морфологические изменения в структурах мозга. Из внешних признаков наиболее явными были нарушения инстинктов и координации движений, заторможенность, отказ от пищи и воды, выпадение шерсти. Введение газообразного O_2^- в зону вдыхаемого воздуха предотвращало патологических изменений и гибель животных.

Наиболее вероятно, что O_2^- и H_2O_2 оказывают воздействие на регуляторные центры мозга через рецепторы полости носа, в частности, вомероназальный орган. Обнаружено, что O_2^- и H_2O_2 при эндоназальном воздействии угнетают активность монооксигеназ гипоталамуса и базальных ганглий мозга, активируя дофаминэргическую и серотонинэргическую системы, уменьшая уровень эндогенного окислительного стресса в этих структурах мозга. Таким образом, биологическое действие аэроионов реализуется через сложную систему регуляции функционального состояния клеток и организма в целом, а O_2^- является главным компонентом в этой системе.

Таким образом, исследования действия экзогенного O_2^- на животных и ряд других работ показали большое регуляторное влияние АФК на различные процессы, протекающие в организме. По мнению многих исследователей, представления о целесообразности для организма повышения антиокислительного статуса для предотвращения окислительного повреждения должны быть пересмотрены. Видимо, положительным для организма является поддержание оптимальных концентраций АФК и соответствующее этим условиям состояние антиокислительной системы.

3.7. «Макроскопические флуктуации» гистограмм распределений.

С.Э.Шноль с сотрудниками проводил чрезвычайно длительные (около 40 лет) и кропотливые эксперименты по регистрации особенностей распределений результатов измерений для различных процессов. В этих исследованиях были проанализированы многие объекты от скоростей биохимических реакций до радиоактивного распада. Были обнаружены макроскопические флуктуации – закономерные изменения тонкой структуры выборочных распределений результатов измерений для процессов разной природы. Измеряемые величины группировались около двух-трех дискретных значений, а промежуточные значения были очень редки. Наиболее вероятны повторения гистограмм в близких интервалах времени. Следует отметить, что такой феномен не противоречит каким-либо «основам науки». Нет сомнений, что исследуемые процессы подчиняются классической статистике, которая ни чего не говорит о тонкой структуре распределения.

В одном из экспериментов были исследованы гистограммы, построенные по результатам синхронных измерений альфа-активности препаратов ^{239}Pu в Пушино и на судне «Академик Федоров» в ходе экспедиции в Арктику (2000 г.) и в Антарктиду (2001 г.). При построении гистограмм распределений за суммарное время, равное 1 минуте, наблюдается период, равный «звездным суткам» (23 часа 56 мин), и в Пушино и в Арктике при синхронности появления сходных гистограмм в одно и то же местное время. В Антарктической экспедиции синхронность появления сходных гистограмм при измерениях в Пушино и на судне уменьшалась по мере движения на юг.

Во многих экспериментах было показано, что тонкие структуры гистограмм различных случайных процессов сходны друг с другом и изменяются синхронно в лабораториях, удаленных на тысячи километров. Более того, их периодические изменения привели к потрясающему выводу о галактическом источнике влияния на распределение измеряемых значений. Возможным объяснением таких явлений может быть структурированность пространства. Однако такого рода объяснения не имеют какой-либо рациональной базы для описания данных явлений.

4. Влияние оптического излучения Солнца на биологические системы

4.1. Оптическое излучение Солнца.

Солнце является основным источником энергии на Земле. Излучение Солнца является фоновым, но его ни как нельзя считать слабым. Энергия, проходящая через площадку перпендикулярно распространению солнечных лучей на орбите Земли, составляет 1370 Вт/м^2 . До поверхности Земли доходит не более 1000 Вт/м^2 . В последние десятилетия наблюдается «глобальное затенение» - снижение пропускания атмосферой

за счет аэрозолей. В северном полушарии это привело к снижению интенсивности облучения на 2-4%, а в южном – вдвое меньше.

Спектр излучения солнца представлен на [рис 12](#). В спектре солнца присутствует УФ-диапазон (280-400 нм), видимый - (400-750 нм) и ИК - (длиннее 750 нм). Коротковолновая составляющая излучения обусловлена поглощением кислорода и озона. Наиболее коротковолновое излучение на поверхности земли в отсутствие нарушений озонового слоя – 280 нм. Принята классификация по эффекту действия на кожу белого человека. УФ излучение делят на УФ-А (320-400 нм) - практически не вызывает эритемы и загара, УФ-В (280-320нм)- вызывает эритему и загар, УФ-С (короче 280нм)- вызывает эритему без загара. На УФ-А приходится не более 7% энергии солнечного излучения, на УФ-В –1.5%, а УФ-С –практически отсутствует.

Энергия кванта света может быть рассчитана по формуле: $E(\lambda)=hc/\lambda$, где $h=6,623 \cdot 10^{-34}$ Дж с. В фотохимии и фотобиологии, когда количество вещества выражают в молях, а концентрацию в молях на литр, принято использовать энергию не одного фотона, а число Авогадро ($N_A=6,023 \cdot 10^{23}$ моль⁻¹) фотонов. Энергию моля квантов называют *Эйнштейном (E)*. Она может быть определена по формуле:

$$E = N_A h \nu .$$

Величина 1 эйнштейна зависит от длины волны света.

Поток излучения (мощность излучения) Φ – энергия, переносимая через некоторую поверхность за единицу времени (Вт, Дж/с, Е/с).

Интенсивность света I – поток света, падающий на единицу площади поверхности, перпендикулярной направлению распространения света (Вт/м², Дж/(м²·с), Е/(м²·с)).

Доза излучения D – произведение интенсивности на время излучения (Дж/м², Е/м²).

Если 1 эйнштейн попадает на площадь в 1 м² за 1 с, то интенсивность светового потока

При 300 нм $I = 1 \text{ Е}/(\text{м}^2 \cdot \text{с}) = 400 \text{ кДж}/(\text{м}^2 \cdot \text{с}) = 400 \text{ кВт}/\text{м}^2$,

а при 500нм $I = 1 \text{ Е}/(\text{м}^2 \cdot \text{с}) = 240 \text{ кДж}/(\text{м}^2 \cdot \text{с}) = 240 \text{ кВт}/\text{м}^2$.

В таблице 3 приведены энергетические характеристики для ряда участков оптического спектра.

Таблица 3. Характеристики отдельных участков оптического спектра.

Цвет	Типичная длина волны, нм.	Частота, Гц $\times 10^{14}$	Энергия, эВ на квант	Энергия, кДж на моль квантов (эйнштейн)
Ультрафиолетовый	254	11,8	4,88	472,5
Фиолетовый	410	7,31	3,02	292,7
Синий	460	6,52	2,70	261,2
Зеленый	520	5,77	2,39	231
Желтый	580	5,17	2,14	207
Оранжевый	620	4,84	2,0	194
Красный	680	4,41	1,82	176,8
Инфракрасный	1400	2,14	0,88	85,7

В отличие от дозы облучения (D) поглощенная доза (P) равна произведению дозы облучения на поглощение объекта, соответствующее $1-T$, где T -пропускание.

$$P = I \cdot t \cdot (1-T)$$

В исследованиях фотосинтетических процессов часто пользуются интенсивностью света в диапазоне длин волн от 400 до 700 нм, называемую фотосинтетически активной радиацией (ФАР). ФАР принято выражать в Вт/м², в микромолях квантов/(м²·с).

Исторически сложилось, что для измерения световых потоков и освещенностей использовали такие светотехнические единицы, как люмен (лм) и люкс (лм/м²). Эти единицы измерения удобны для оценки восприятия света человеком. В фотометрической системе за основу взята сила света – кандела (кд), равная 1/60 силы света излучаемого по нормали из 1 см² светового эталона. Эталонем служит платина, нагретая до температуры плавления (1769 °С). Спектр излучения эталона приближен к спектральной чувствительности глаза человека. За единицу светового потока принят люмен (лм). Один люмен соответствует потоку от источника силой света в 1 кд, посылаемому в телесный угол в 1 стерадиан (ср).

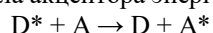
$$1 \text{ лм} = 1 \text{ кд} / 1 \text{ ср}.$$

Единица освещенности, люкс (лк) определяется как поток света в 1 лм, равномерно распределенный на площадь 1 м². $1 \text{ лк} = 1 \text{ лм} / 1 \text{ м}^2$.

Если источник света известного спектрального состава дает определенный световой поток, выраженный в люменах, то можно определить этот поток в ваттах и установить связь между световыми и энергетическими единицами. Однако для разных длин волн, единого коэффициента пересчета не существует. Для длины волны света, соответствующей максимуму чувствительности глаза ($\lambda=555 \text{ нм}$), он равен $1,471 \cdot 10^{-3} \text{ Вт/лм}$. Соответственно, коэффициент пересчета Вт/м² в люксы на длине волны 555 нм равен 683 лм/Вт. Для других длин волн этот коэффициент имеет другие значения.

4.2. Свойства электронно-возбужденных состояний молекул.

Поглощение кванта света молекулой переводит ее из основного в электронно-возбужденное состояние. Молекула может оказаться в возбужденном состоянии не только за счет прямого поглощения кванта света, но и в результате ряда других процессов. Одним из них является безизлучательный перенос энергии от другой возбужденной молекулы. В результате такого, миграционного, переноса энергии возбужденная молекула донора D* энергии переходит в основное (невозбужденное) состояние D, а молекула акцептора энергии переходит из невозбужденного состояния A в возбужденное A*.



Миграция энергии может происходить между молекулами одного вещества и между хромофорными группами одной молекулы. В белках возможен перенос энергии возбуждения с одного аминокислотного остатка на другой. Например, с триптофана на тирозин.

Энергии кванта света близка к энергии ковалентных связей и ее достаточно для разрыва химической связи. Молекула, поглотившая квант света и оказавшаяся в возбужденном состоянии, приобретает новые свойства по сравнению с той же молекулой в основном состоянии. Это происходит в связи с тем, что при возбуждении изменяется соотношения электронных плотностей в молекуле и пространственную структуру. Молекула в возбужденном состоянии приобретает новое значение константы диссоциации (pK_s^*), которое может быть на несколько единиц больше или меньше константы диссоциации молекулы в основном состоянии (pK_{s0}).



Диссоциированные молекулы могут рекомбинировать. Скорость рекомбинации зависит от среды. В воде среднее время жизни диссоциированных частиц порядка 10^{-7} с . Таким образом, под действием света возбужденные молекулы могут изменить pH среды, в которой они находятся. Эти возможности продемонстрированы в таблице 4.

Таблица 4. Изменения константы диссоциации при переходе молекулы из основного состояния (pK_{s0}) в синглетно возбужденное (pK_s^*). (А.Н.Теренин «Фотоника молекул красителей», Л. Наука, 1967.)

Вещество	pK_{s0}	pK_s^*
2-Нафтол	9,5	3,1
2-Нафтойная к-та	4,2	10,5
Акридин	5,5	10,6

В клетке присутствует множество веществ с разнонаправленными изменениями константы диссоциации. Видимо, под действием излучения сплошного спектра, например солнечного света, разнонаправленные изменения константы диссоциации разных веществ, поглощающих в разных областях спектра, компенсируют друг друга. При действии монохроматического излучения такой компенсации не происходит. Этим может быть объяснено регуляторное действие на клетки и ткани монохроматических излучений, в частности, лазерного излучения. Не исключено, что изменения константы диссоциации основного и возбужденного состояния молекул явилось одним из факторов, повлиявших в ходе эволюции на состав молекулярных компонентов организма.

Возбужденная молекула может стать мощным донором электронов, терять протон (депротонироваться), претерпевать изомеризацию или многие другие превращения, механизм которых обусловлен электронным строением молекулы. В силу этих обстоятельств, протекают химические реакции под действием оптического излучения - фотохимические и фотобиологические реакции. Такие реакции играют чрезвычайно большую роль в функционировании индивидуальных организмов и экосистем в целом. Некоторые частные случаи действия оптического излучения на биологические объекты рассмотрены ниже.

К сожалению, до настоящего времени не выяснена роль фотохимических процессов в генерации АФК и их влияние на состояние органических веществ, растворенных в природных водах. Если учесть что в Океане растворенной органики по массе примерно в 10 раз больше, чем всех компонентов биоты, то глобальный масштаб влияния фотохимических процессов на состояние вод трудно переоценить.

4.3. Восприятие света человеком.

Физиологические и биофизические механизмы зрения подробно описаны во многих учебных пособиях и не требует дополнительного описания. Биологическое действие оптического излучения можно оценить визуально. При этом следует учитывать, что восприятие света человеком имеет ряд особенностей и

ограничений, требующих специального описания. Абсолютный порог чувствительности зрения человека, адаптированного в темном помещении, принято считать порядка 100 квантов в секунду в сине-зеленой области спектра. Порог чувствительности составляет десятки квантов в секунду. Он снижается у людей старше 20 лет и сильно зависит от состояния человека. В глазу человека содержатся два типа светочувствительных клеток: высокочувствительные палочки, отвечающие за сумеречное зрение, и менее чувствительные колбочки, отвечающие за цветное зрение. В зависимости от ключевых аминокислот в молекуле опсина в колбочках белок родопсин реагирует на одну из трех областей спектра: синей, зеленой и красной.

Зрение позвоночных до выхода на сушу было тетрахроматичным. Такое устройство зрения сохранилось у ряда позвоночных, например, у птиц. У большинства млекопитающих сохранилось только два опсина. За цветное зрение человека и приматов Старого Света отвечают три гена, кодирующие светочувствительные белки опсины. Наличие трёх разных белков, связанных с ретиналем и реагирующих на разные длины волн, позволяет получить цветное восприятие. При этом следует учитывать, что восприятие цвета представляет собой только сочитание яркостей в трех спектральных диапазонах. Эти же три спектральных диапазона воспроизводят цвет на экранах телевизоров и мониторах компьютеров. Спектры отражения или поглощения содержат существенно бóльшую информацию об объекте, чем сочитание яркостей в трех спектральных диапазонах. При этом из спектра излучения можно однозначно получить значение яркостей в любых диапазонах спектра.

Возможно, если бы у людей зрение было тетрахроматичным, нам казалась бы убогой трихроматическая система отображения цвета, используемая в наших телевизорах и компьютерных мониторах. Следует отметить, что мы воспринимаем цвет предметов, как одинаковый, при разном освещении объекта. Возможно, в мозг поступают не просто значения интенсивностей в синей, зеленой и красной областях спектра, а соотношения этих интенсивностей.

Ощущение яркости света имеет логарифмическую зависимость от интенсивности освещения. При слабом освещении максимум чувствительности глаза человека приходится на спектральную область около 500 нм - «сумеречное зрение». Цветное зрение глаза человека при дневном освещении, когда воспринимается цвет объекта, имеет максимум чувствительности в зеленой области спектра и соответствует длине волны 555 нм. На основании многочисленных измерений установлена относительная чувствительность, характерная для среднего нормального глаза. Относительная чувствительность цветного зрения человека называется *кривой видности* и приведена в таблице 5.

Таблица 5. Относительная спектральная чувствительность глаза человека.

λ , нм	к	λ , нм	к	λ , нм	к	λ , нм	к
400	0,0004	480	0,139	560	0,995	640	0,175
420	0,004	500	0,323	580	0,870	660	0,061
440	0,023	520	0,710	600	0,631	680	0,017
460	0,06	540	0,954	620	0,381	700	0,0041

(*Спектральная чувствительность, приведенная в таблице, утверждена Международной осветительной комиссией (МОК).

Следует отметить, что мы воспринимаем цвет предметов, как одинаковый, при разном освещении объекта. Возможно, в мозг поступают не просто значения интенсивностей в синей, зеленой и красной областях спектра, а соотношения этих интенсивностей.

4.4. Биологические эффекты действия оптического излучения.

Одна из главных задач в изучении фотобиологических процессов – определение веществ, поглощающих излучение и участвующих в первичном фотохимическом акте. В результате фотохимического акта может произойти фотохимический акт, например, приводящий к инактивации молекулы. Вероятность инактивации молекулы называется квантовым выходом инактивации - ρ . Вещества, подвергающиеся фотоинактивации, могут быть охарактеризованы поперечным сечением инактивации $\sigma = s \rho$, где s – поперечное сечение поглощения. Для определения веществ, поглощающих излучение и участвующих в первичном фотохимическом акте, сравнивают *спектр действия* фотохимического превращения со спектром поглощения. (*Спектр действия – зависимость сечением инактивации σ от длины волны действующего света.) Совпадение спектра поглощения и спектра действия свидетельствует о том, что вещество поглощающее излучение производит эффект фотохимического превращения. Например, фотоинактивация ферментов при УФ-облучении, когда спектр действия фотоинактивации совпадает со спектром поглощения фермента. Спектр действия повреждений, измеряемый количеством мутаций, соответствует спектру поглощения ДНК. Эта реакция протекает по одноударному механизму, о чем свидетельствует линейная зависимость эффекта от интенсивности облучения.

Приведенные примеры очень просты. Часто во многих биологических системах могут возникать значительные трудности в определении истинного спектра действия из-за экранирования другими пигментами.

Многие молекулы при возбуждении становятся мощным донором электронов. Также донором электрона становится и возбужденная молекула белка, за счет чего могут происходить изменения ее конформации. Имеющиеся в белке хромофорные группы могут быть более или менее значимы для сохранения активности фермента.

Поперечное сечение инактивации белка является суммой поперечных сечений аминокислот, входящих в его состав (Табл. 6). Каждый аминокислотный остаток имеет свой спектр поглощения и поперечные сечения аминокислотных остатков на любой длине волны известны. Измерение инактивации белка при облучении несколькими длинами волн позволяет определить вклад каждой из аминокислот в фотоинактивацию белка. При действии солнечного УФ-излучения повреждение белков происходит главным образом за счет триптофана и тирозина. Фотолиз дисульфидной связи типичен для действия коротковолнового УФ-излучения, выходящего за диапазон солнечной радиации на поверхности земли.

Таблица 6. Фотохимическая чувствительность аминокислот при 254 нм.

Соединение	Молярный коэффициент поглощения, л/моль см	Квантовый выход фотохимической реакции ρ	Поперечное сечение фотохимической реакции σ , 10^{-20} см ²
Цистин	270	0,13	13,4
Триптофан	2870	0,004	4,4
Фенилаланин	140	0,013	0,69
Тирозин	320	0,002	0,23
Пептидная связь	0,2	0,05	0,004
Гистидин	0,24	<0,03	<0,003

Для растений и водорослей УФ-излучение является мощным фактором повреждения. Основной мишенью УФ-излучения является белок Д1 ФС2, а также система синтеза белков. Высшие растения при УФ-облучении синтезируют в тканях эпидермиса фенольные соединения: флавоноиды (рутин, кверцетин), каротиноиды и антоцианы. Содержание этих соединений может быть определено по спектрам отражения листьев и плодов. Водоросли могут окружать себя полисахаридными слизями, эффективно поглощающими УФ-излучение.

Под действием коротковолнового УФ-излучения ненасыщенные липиды в присутствии кислорода подвергаться фотопревращениям, в результате которых могут образовываться гидропероксиды, а затем из них – альдегиды или кетоны. Фотоиндуцированное образование гидроперекисей, как правило, обусловлено сенситизаторами, а распад гидропероксидов протекает путем прямого действия излучения на них с образованием альдегидов и кетонов. Окислительные процессы в липидах вызывают появление в мембране гидрофильных участков, даже при очень низкой концентрации это приводит к резкому снижению электрического сопротивления мембраны и нарушению ее проницаемости.

Действие УФ-радиации на организм человека имеет чрезвычайно сложный характер. Спектр пропускания поверхностных тканей человека приведен на [рис. 13](#). Из этого спектра видно, что пропускание растет с увеличением длины волны и что на большую глубину может проникнуть свет дальней красной и инфракрасной области спектра.

На [рис. 14](#) приведен спектр действия эритемы, который определяют как зависимость от длины волны 1/дозу поглощенного излучения, которое вызывает эритему (стойкое покраснение кожи, возникающее вследствие расширения кровеносных сосудов). Максимумы спектра действия эритемы соответствуют 245-248 нм и 297 нм. Характеристики эритемы, вызываемой разными участками УФ-спектра сильно различаются. По этим признакам УФ-излучение принято делить на три области: УФ-А (320-400 нм), УФ-В (280-320 нм) и УФ-С (<280 нм). УФ-А-излучение характеризуется тем, что оно обладает в 100-1000 раз меньшей эритемой эффективностью, чем при 297 нм. УФ-В-излучение приводит к эритеме после латентного периода, длительность которого обратно пропорциональна дозе. Степень покраснения пропорциональна логарифму дозы облучения. В больших дозах вслед за яркой эритемой появляется заполненные жидкостью пузыри – ожог, называемый эдемой. Если на кожу нанесены антиоксиданты α -токоферол или ионол эритема от действия УФ-В-излучения существенно ослабляется. УФ-С-излучение вызывает эритему в большой степени схожую с эритемой от УФ-В-излучения, но она проходит быстрее и никогда не вызывает отека. Наиболее вероятно, что действию разных спектральных областей УФ-излучения, вызывающих эритему, соответствуют разные хромофоры.

Эритема развивается в глубине тканей в клетках - меланоцитах. Роговой слой поглощает и рассеивает излучение, играя роль фильтра. На основании знания о спектре действия эритемы невозможно установить, какое конкретное вещество отвечает за данный эффект. Изменения спектра действия эритемы происходят при экранировании меланоцитами и зависит от степени загара. Возможно, за эритему ответственны белки или витамин Е. Эритема возникает не в момент облучения, а позже. Такой «отсроченный эффект» предполагает сложность процесса, приводящего к эритеме.

Загар является реакцией на фотоповреждение. Пигментация кожи, обусловленная меланином, защищает кожу от фотоповреждения. Меланины играют роль экрана, ослабляющего интенсивность излучения, а также ловушки для свободных радикалов и осуществляют связывание ионов Fe^{2+} , катализирующих перекисное окисление липидов. Известно два вида пигментации: непрямая возникающая в ответ на действие излучения с длиной волны <320 нм спустя 2-3 суток после облучения и прямая, вызываемая широким спектром излучения от 300 до 700 нм с максимумом эффекта 400-480 нм через 1-2 часа. Первичные стадии возникновения загара до сих пор не ясны. Известно, что УФ-В-излучение вызывает в коже активацию тирозиназы, активирующей синтез меланина из тирозина. Большие дозы УФ-С-излучения

блокирует образование меланина. Прямая пигментация, вызываемая видимым светом, обусловлена непосредственным фотохимическим окислением восстановленного предшественника меланина.

Меланины являются широко распространенными в природе пигментами не только среди млекопитающих. Они окрашивают многие организмы различных таксономических групп, например, грибы и хитиновые покровы насекомых.

УФ-облучение вызывает *иммуносупрессию* – подавление клеточного иммунитета. Иммуносупрессия проявляется на уровне всего организма. Механизм этой реакции обусловлен транс-цис изомеризацией уроганиновой кислоты. Такое действие на иммунную систему цис-уроганиновой кислоты известно. Видимо, вызываемая УФ – излучением иммуносупрессия, обусловлена тем, что снижает аутоиммунную атаку на антигены, возникающие в коже при ее повреждении излучением. Иммуносупрессия может иметь положительные и отрицательные стороны. Она усугубляет протекание онкологических заболеваний и облегчает симптомы псориаза. В большом числе случаев рак кожи и катаракта являются следствием действия УФ-излучения. Предполагается, что главную роль в этих заболеваниях играют повреждение ДНК и фотоокисление липидов. В зависимости от широты частота заболеваний раком кожи среди мужчин изменяется от 120 на 100000 человек (32 градуса С.Ш.) до 25 на 100000 (40 градусов С.Ш.). В зависимости от высоты над уровнем моря частота онкологических заболеваний кожи повышается в 2,5-3 раза на каждую 1000 м. В тоже время такое облучение приводит к улучшению состояния больных псориазом вследствие иммуносупрессии. Недостаток УФ-излучения приводит к D-авитаминозу в связи с тем, что синтез этого витамина на заключительном этапе происходит за счет фотохимических превращений.

Фотоаллергические реакции наиболее часто происходят после приема ряда лекарственных препаратов (хлорпромазин, сульфаниламиды и другие), содержащие хромофорные группы, которые поглощают в видимой и УФ-А-области спектра. При возбуждении эти вещества присоединяются к белкам. Модифицированные белки распознаются иммунной системой, как чужеродные антигены.

Фотосенсибилизированные реакции в биологических системах

Биологические объекты обладают чувствительностью к свету за счет присутствия эндогенных и экзогенных хромофоров. Резкое повышение светочувствительности, как правило, связано с попаданием в объект каких-либо хромофоров, поглощающих видимый свет или УФ-излучение. Фоточувствительность может повышаться при некоторых заболеваниях. Соединения, повышающие фоточувствительность биологического объекта принято называть *фотосенсибилизаторами*. Процессы фотосенсибилизации могут протекать без участия кислорода или с обязательным участием кислорода.

Фотосенсибилизированные реакции, не нуждающиеся в кислороде.

Примером кислороднезависимых фотосенсибилизированных реакций является фотоприсоединение псораленов к пиримидиновым основаниям ДНК. Псоралены способны вызывать летальные или мутагенные эффекты под действием УФ-А-облучения микроорганизмов. Псоралены используют для фотохимиотерапии ряда заболеваний кожи, например, псориаза. Фотоприсоединению псораленов к ДНК предшествует темновая стадия, на которой молекулы псораленов встраиваются в двойную спираль ДНК между двумя парами комплементарных оснований. Если рядом с псораленом оказался тимин, то при возбуждении псоралена происходит их ковалентное связывание. В такой реакции может образоваться ряд продуктов, часть из которых способна при поглощении еще одного кванта приводить к образованию ковалентной сшивки между двумя нитями ДНК через псорален. Многие растения, в том числе петрушка, пастернак, сельдерей, апельсины, бергамот, грейпфрут, инжир содержат псоралены. Видимо, этот вторичный метаболит защищают растения от инфицирования микроорганизмами и поедания животными. **Рис.**

Кислородзависимые фотосенсибилизированные реакции протекают при обязательном участии света, красителя и кислорода. В таких реакциях под действием света происходит инициирование генерации свободных радикалов и АФК. В некоторых системах может происходить ускорение окисления какого-либо субстрата в присутствии красителя при облучении его светом. Такие реакции называют фотодинамическими, а красители, вызывающие такие реакции, фотодинамическими красителями. Как правило, в кислородзависимых фотосенсибилизированных реакциях участвуют триплетные состояния фотосенсибилизатора. В таких реакциях может происходить перенос электрона между субстратом и возбужденным сенсибилизатором.

Если субстрат является хорошим донором электрона, то протекает реакция по схеме:

$^3S^* + AH \rightarrow \cdot S + A\cdot + H^+$, где $^3S^*$ – сенсибилизатор в триплетном возбужденном состоянии, АН – окисляемая молекула, $\cdot S$ и $A\cdot$ – радикалы сенсибилизатора и субстрата.

В отсутствие кислорода образующиеся свободные радикалы рекомбинируют и превращаются в исходные соединения, так что химические изменения в системе минимальны. В присутствии кислорода могут происходить реакции свободных радикалов с кислородом:

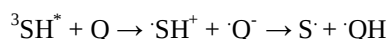
$\cdot S + O_2 \rightarrow S + \cdot O_2$ или $A\cdot + O_2 \rightarrow AOO\cdot$, где $AOO\cdot$ – перекисный радикал субстрата.

Перекисный радикал приводит к возможности продолжения реакций:

$AOO\cdot + AH \rightarrow AOOH + A\cdot$

Дисмутация супероксидных радикалов приводит к образованию перекиси водорода, которая может участвовать в образовании других АФК.

Возбужденная молекула фотосенсибилизатора может являться донором электронов для хинонного акцептора Q:



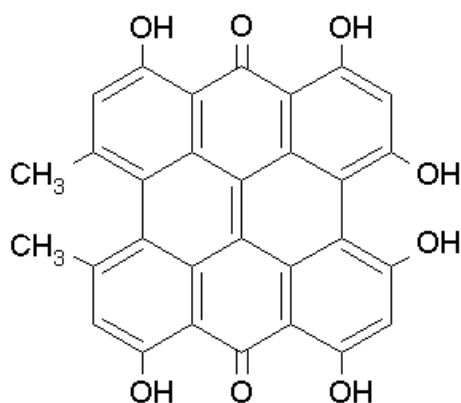
В присутствии второго субстрата окисления (АН), например не насыщенного липида, происходит образование радикального продукта (А·):

$\text{S} \cdot + \text{АН} \rightarrow \text{SH} + \text{А} \cdot$, что при участии кислорода может приводить к образованию перекисного радикала субстрата (АОО·).

Фотосенсибилизированные реакции могут протекать за счет синглетного кислорода участвовать, возникающего за счет триплет-триплетного переноса энергии с красителя на кислород: $^3\text{S}^* + ^3\text{O}_2 \rightarrow ^1\text{S}_0 + ^1\text{O}_2$. (свойства синглетного кислорода см. в гл.)

В природе реакции, протекающие по такому механизму, встречаются весьма часто. В частности, синглетный кислород может генерировать хлорофилл в триплетном состоянии. (вопрос рассмотрен в гл.) Одним из самых сильных природных фотосенсибилизаторов (квантовый выход генерации синглетного кислорода равен = 0.8) является содержащийся в зверобое гиперин (рис. 15). Травоядные животные избегают питаться этим растением, поскольку после поедания листьев этот пигмент попадает в кровь и затем на свету вызывает эритемы. В медицине гиперин используют в качестве антибактериального и противовирусного препарата, а также для химиотерапии ряда раковых заболеваний.

Рис.15



Гиперин

Hypericum perforatum (Зверобой)

Пигменты-фотосенсибилизаторы синтезируют не только растения. Грибы рода Cercospora вырабатывают церкоспорин, который на свету вызывает повреждение и гибель клеток растения в результате образования синглетного кислорода. Ослабив таким образом растение гриб способен колонизировать растение. Обработка растений церкоспорином имитирует симптомы заболевания, вызываемого этими грибами. В настоящее время синтезировано множество фотосенсибилизаторов. Некоторые из них используются в фотодинамической терапии опухолей.

Лечение некоторых заболеваний светом

Видимый свет может вызывать не только прямую пигментацию, но и оказывать ряд других воздействий. Свет видимого диапазона используют для лечения желтухи новорожденных, которая обусловлена недостатком глюкуроилтрансферазы, превращающей билирубин (плохо растворимый в воде продукт распада гемоглобина) в водорастворимый конъюгат глюкуроновой к-ты. При облучении синим светом билирубин фотоизомеризуется и, переходя в водорастворимое состояние, выводится из организма. Если фототерапия не используется, билирубин накапливается в тканях мозга и приводит к его повреждению и неврологическим заболеваниям.

Фотопериодизм - это реакция организма на световой суточный ритм. Фотопериодизм разных организмов обусловлен разными механизмами и, соответственно, разными фотохимическими актами. Рецепторы светового излучения млекопитающих обнаружены в ганглионарных клетках сетчатки глаза. Эти клетки не связаны со зрительной рецепцией. Они содержат меланопсин – белок-пигментный комплекс, поглощающий в синей области спектра. Таким образом, глаз не только обеспечивает зрительную рецепцию, но и поддерживает суточную ритмику организма. В организме человека эпифиз (шишковидная железа) вырабатывает гормон - мелатонин. Он вырабатывается основными секреторными клетками эпифиза – пинеалоцитами. Максимальные значения мелатонина в крови наблюдаются между полночью и 4 часами утра. Время биологического полураспада мелатонина равно 45 минутам. В темноте содержание мелатонина может увеличиваться до 100 раз по сравнению с условиями пребывания на интенсивном солнечном свете.

Мелатонин - редкий пример гормона, к которому имеются как мембранные, так и ядерные рецепторы. У млекопитающих имеется два мембранных рецептора мелатонина - MTNR1A, экспрессирующийся в основном на клетках передней доли гипофиза и супрахиазмных ядер гипоталамуса,

но также присутствующий во многих периферических органах, и MTNR1B, экспрессирующийся в некоторых других участках мозга, в сетчатке глаза и в легких. У птиц, амфибий и рыб имеется третий рецептор - MTNR1C, который у млекопитающих пока не клонирован. Рецепторы мелатонина относятся к семейству рецепторов, связанных с G-белками, и действуют через G_s-белок, снижая уровень цАМФ. Недавно открытые ядерные рецепторы мелатонина относятся к подсемейству RZR/ROR ретиноидных рецепторов. Видимо, через них опосредуются многие иммуностимулирующие и противоопухолевые эффекты мелатонина.

Мелатонин многофункциональный гормон, который регулирует деятельность эндокринной системы, кровяное давление, периодичность сна, а также сезонную ритмику у многих животных. Мелатонин усиливает эффективность функционирования иммунной системы и обладает антиоксидантными свойствами.

4.5. Фоторецепция и фоторегуляция растений и микроорганизмов.

(Детальное рассмотрение этой темы представлено в обзоре Г.Я. Фрайкин, М.Г. Страховская, А.Б. Рубин «Биологические фоторецепторы светозависимых регуляторных процессов», Биохимия, 2013, т.78, №11, с. 1576-1594.)

Высокая инсоляция приводит к формированию широкой кроны или розетки листьев растения. В затененном месте те же растения «тянутся к свету» и образуют сильно вытянутые стволы или стебли. Высокая инсоляция растений вызывает многие биохимические изменения и, в том числе, появление защитных пигментов. Соотношение длительности светлого и темного времени суток определяют у растений переход от стадий начального развития и роста растений к формированию репродуктивных органов (цветению). Изменением периода освещения при прочих равных условиях можно вызвать или не допустить цветение ряда растений.

Биологические объекты воспринимают световые воздействия специальными фоторецепторами, преобразующими физический сигнал в каскад биохимических реакций. Видимо, наиболее совершенной является фоторецепторная система высших растений, включающую пять основных типов фотосенсоров: фитохромы, воспринимающие красный (К)/дальний красный (ДК)-диапазоны спектра (600-750 нм), чувствительные к синему свету криптохромы, фототропины и F-box-белки ZTL/FKF1/LKP2, контролирующие синюю и ультрафиолетовую области спектра (320-500 нм), а также сенсор UV-B излучения в области (290-320 нм) белок UVR8. Комплекс этих фоторецепторов программирует развитие растений и координирует циркадные ритмы.

Фитохромы воспринимают световой сигнал в красной области (660–730 нм). К настоящему времени родственные фитохрому рецепторы найдены у широкого круга организмов, включая грибы, цианобактерии и нефотосинтезирующие бактерии. Растения содержат, по крайней мере, пять фитохромов – А, В, С, D и Е, которые различаются по физиологической роли. Фитохромному контролю у растений подвержены рост, развитие, морфогенез, активность ряда ферментов, синтез рибулозо-1,5- бисфосфат карбоксилазы, хлорофилла, интенсивность фотосинтеза, накопление и распределение ассимилятов.

Фитохромы - хромопротеины имеют в качестве хромофорной группы линейный тетропиррол. Фитохром представляет собой димер, в котором каждый из мономеров с молекулярной массой около 124 кДа имеет хромофор - фитохромобилин. Фитохром может находиться в двух формах, способных под действием света соответствующей длины волны переходить друг в друга. Эти превращения обусловлены цис-транс изомеризацией пиррольных колец в линейном тетропирроле хромофорной группы фитохрома. Первичная фотохимическая реакция приводит к деформации белкового кармана и изменению конформации фитохрома (рис. 16). Одна форма с длиной волны поглощения 660 нм и другая – 730 нм. В свою очередь от состояния фитохромной системы зависит количество и соотношение фитогормонов, которые определяют морфологическое строение, время вхождения в соответствующие фазы онтогенеза и множество физиологических особенностей растения.

На основании сигналов, поступающих от фитохромной системы, растение может: готовиться к фотосинтезу или все запасы органических веществ пустить на рост, приступить к цветению или к листопаду, изменить стратегию роста, прорасти семенам или дожидаться более благоприятных условий и т.д.

Рецепторы синего света и УФА-излучения - криптохромы впервые были обнаружены у растений, а позднее найдены у многих организмов из других таксономических групп. Криптохромы объединяет структурное сходство с ДНК-фотолиазами – флавиновыми ферментами, катализирующими фоторепарацию ДНК после их повреждения УФ-радиацией. Однако у криптохромов отсутствует ДНК-репарирующая активность, и они являются рецепторами для многих фоторегуляторных процессов. Эти рецепторы сигнализируют о направлении роста растения для достижения максимальной освещенности при фототропизме, открытии устьиц и т.д.

Криптохромная система арабидопсиса имеет два белковых комплекса (CRY1 и CRY2). Птерин (метилтетрагидрофолат), входящий в состав криптохромов, играет роль светособирающего хромофора. При поглощении им кванта синего света возбуждение передается в "реакционный центр" криптохрома - на молекулу флавинадениндинуклеотида (ФАД). Наличие двух хромофоров объясняет тот факт, что физиологический спектр действия криптохрома совпадал как со спектром флавинов, так и со спектром птеринов. ФАД в составе криптохрома 1 находится в стабильной семихинонной форме (т.е. он частично

восстановлен и может легко отдавать электроны). Семихинонная форма ФАД поглощает не только синий, но и зеленый свет. Таким образом, физиологический ответ у растения вызывает его облучение и синим, и зеленым светом. Получив квант света, электрон флавинового ядра возбуждается и изменяет значение своего редокс-потенциала. Флавин в возбужденном состоянии является сильным восстановителем. Конкретный механизм передачи сигнала еще не изучен, но в настоящий момент существует ряд гипотез относительно каскадов реакций, приводящих, в конечном счете, к биологическим эффектам.

Фототропины (phot1 и phot2) являются связанными с плазматической мембраной серин/треонин-протеинкиназами. Они активируются синим светом и влияют на фототропизм, открывание устьиц листа и внутриклеточное перемещение хлоропластов в зависимости от интенсивности действующего света. Фототропины регулируют процессы, направленных на оптимизацию фотосинтеза и роста растений в условиях слабой освещенности, а также способствуют уменьшению риска фотоповреждений. Структура фототропина может быть разделена на две области: N-терминальную фотосенсорную и C-терминальную эффекторную, содержащую серин/треонин-киназный домен. N-терминальная область включает два домена, каждый из которых нековалентно присоединяет кофактор FMN_{ox} в качестве хромофора. В темноте домен со связанным FMN_{ox} имеет максимум поглощения при 447 нм. При воздействии синего света домен подвергается фотоциклу, который сопровождается формированием аддукта с максимумом поглощения при 390 нм.

Несмотря на большие успехи в исследованиях, посвященных работе фототропиновых рецепторов растений, механизм их функционирования остается не ясным. Сложный характер фототропинового сигналирования обусловлен разнообразием ответов, которые эти фоторецепторы опосредуют, и главная задача будущих исследований состоит в расшифровке сигнальных сетей и идентификации вовлекаемых в них молекулярных компонентов.

Близкие к фототропинам структуры обнаружены у грибов и бактерий, в частности у цианобактерий. Они способны регулировать активность различных эффекторных белков этих организмов на действие света. Широкое распространение схожих с фототропинами фотосенсоров у прокариотических клеток позволяет считать, что синий свет является важным фактором среды обитания даже для хемотрофных микроорганизмов.

Как известно, UV-B излучение является мощным повреждающим фактором среды, способным индуцировать деструктивные реакции в ДНК и белках растений, вызывая цитотоксические эффекты. При низких интенсивностях UV-B излучение служит сигналом, который воспринимается и используется растениями для активации различных физиологических процессов, включая экспрессию генов, связанных с УФ-защитой. Это обеспечивает УФ-акклиматизацию растительных организмов на солнечном свете. Сенсором в таких защитных реакциях растительного организма от действия UV-B излучения является фоторецептор UVR8, который идентифицирован и охарактеризован на молекулярном уровне только в самое последнее время. UVR8 – это семилистовой β-пропеллерный белок, содержащий пирамидную структуру из 14 триптофановых остатков. От фитохромов и криптохромов, а также всех других известных биологических фоторецепторов UVR8 отличает отсутствие фотохимически активного простетического хромофора. В качестве главной «UV-B антенны» у UVR8 идентифицирован Trp285. Другая уникальная особенность UVR8 состоит в том, что этот сенсор фотонов содержит UV-B-чувствительные триптофановые «пирамиды» - структуры, которые ранее обнаружены не были.

Дальнейшие работы по расшифровке механизмов действия UVR8, видимо, будет направлена на выяснение взаимодействия мономеров фоторецептора UVR8 с другими компонентами клетки.

4.6. Фотоиндуцированное движение клеток водорослей.

Многие водоросли способны к активному движению. Например, клетки зеленой жгутиковой водоросли *Dunaliella* в природных бассейнах могут изменять свое местопребывание в процессе поисков оптимальных условий освещения. Клетки вида *D. salina* обитают в соленых водоемах. В теплое время года днем они обычно скапливаются у поверхности водоема, а ночью опускаются в придонные слои. Зимой большинство вегетативных и покоящихся клеток *Dunaliella* пребывают на дне водоема, где аккумулируется наиболее концентрированная вода, обладающая наибольшей теплоемкостью. Ранней весной именно в придонных слоях начинается оживленная вегетация водорослей, окрашивающих их в зеленый или розовый цвета, в то время как поверхностные слои еще долгое время остаются прозрачными, неокрашенными. Летом, когда степень освещенности водоемов достигает максимальных значений, наблюдается своеобразное распределение *Dunaliella* в толще воды. Красные, богатые каротином клетки *D. salina*, скапливаются у поверхности, а зеленые клетки этого вида и клетки некаротиноносных видов парят в более глубоких придонных слоях воды. Фоторецепторная система видов *Dunaliella*, как и других зеленых водорослей, состоит из фоторецептора, предположительно расположенного в плазмалемме и в мембранах хлоропластной оболочки (в области, прилегающей к стигме) и стигмы, состоящей у разных видов из одного-двух слоев липидных глобул, расположенных в периферической зоне пластиды.

Спектр действия фототопотаксиса двух гипергалобных видов *Dunaliella* идентичен; он находится в пределах 400–520 нм и имеет два максимума: при 410–415 нм и 465–475 нм. Спектр действия фототопотаксиса *Dunaliella* sp. несколько отличается от таковых *Chlamydomonas reinhardtii* и *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*), демонстрирующих широкую полосу в области 400–550 нм с максимумом при 500

нм, и существенно отличается от спектров действия фотототаксиса *Tetraselmis viridis* (*Chlorodendrophyceae*) и *Euglena gracilis* (*Euglenophyta*). В отличие от представителей Chlorophyceae *Tetraselmis viridis* проявляет способность к фототопотаксису и в ультрафиолетовой области спектра. *Euglena gracilis* демонстрирует фототопотаксис в области 300–550 нм с двумя основными максимумами при 385 нм и 460 нм и двумя небольшими максимумами при 410 и 490 нм.

Таким образом, представители разных родов, классов и отделов существенно отличаются по спектрам действия фототопотаксиса, что свидетельствует о различии в наборах фоторецепторных пигментов.

Учитывая особенности фоторецепторных систем водорослей, в частности, строение стигмы, можно полагать, что всем монадным жгутиковым водорослям за исключением тех, у которых отсутствует стигма, свойственен наиболее древний, первичный модуляционный механизм фоторецепции, унаследованный от прокариот или общих с ними предков. У некоторых зеленых водорослей могут одновременно функционировать три механизма, повышающие интенсивность поглощаемого фоторецептором светового сигнала (модуляционный, дифракционный и интерференционный).

Немаловажную роль в фоторегуляции движения жгутиковых водорослей играют белковые молекулы, входящие в состав, как фоторецепторных систем, так и жгутикового аппарата и, в частности, конформационные изменения, которые претерпевают эти молекулы под влиянием стимулирующего света.

В многочисленных работах показано, что фоторегуляция движения у зеленых жгутиковых водорослей *Chlamydomonas reinhardtii* опосредовано фоторецепторами родопсинового типа. Каскад быстрых Ca^{2+} -зависимых электрических реакций клеточной мембраны играет ключевую роль в цепи трансдукции сигнала фоторегуляции движения. Фоторегуляторный ток, видимо, является первичным явлением в ответ на возбуждение фоторецептора. Анализ фоторегуляторных токов выявил два компонента, соответствующих двум типам родопсинов. Синтез этих белков определяется двумя генами, блокирование каждого из которых отвечает за свой компонент фоторецепторного тока. При этом оба родопсина вовлечены как в фототаксис, так и в фотобобную реакцию водоросли.

4.7. Биологические эффекты действия монохроматических излучений.

Вскоре после изобретения лазеров появились новые технологии лечения ряда заболеваний людей и регулирования физиологических процессов у различных биологических объектов действием монохроматических излучений. До последнего времени механизм действия низкоинтенсивных лазерных излучений не раскрыт. При обсуждении возможных механизмов действия низкоинтенсивных лазерных излучений следует учитывать следующие достоверно установленные в клинической практике факты.

Эффект действия низкоинтенсивных лазерных излучений обусловлен их монохроматичностью, но не когерентностью, так как аналогичные биологические эффекты могут быть достигнуты при воздействии излучения в узкой спектральной полосе от обычного источника света. Излучение в области 400–600 нм вызывает ускорение деления клеток микроорганизмов, а также увеличение синтеза белков. При этом наблюдается колоколообразная зависимость эффекта стимуляции от дозы облучения. Облучение изолированных митохондрий печени светом He-Ne-лазера приводит к увеличению в них содержания АТФ и увеличению градиента рН в матриксе. Облучение фибробластов человека светом He-Ne-лазера увеличивает скорость роста популяции этих клеток. Под действием облучения He-Ne-лазера в оптимальной дозе увеличивается содержание внутриклеточного кальция в лейкоцитах. При облучении крови непосредственно в кровеносных сосудах наблюдается расширение сосуда выше и ниже места облучения.

В 1994 году Ю.А.Владимиров сформулировал три гипотезы относительно механизма действия низкоинтенсивных лазерных излучений на клетки и организм человека: 1) фотодинамическое действие на мембраны, сопровождаемое увеличением внутриклеточного кальция и стимуляцией клеток; 2) фотореактивация Cu-Mn-супероксиддисмутазы; 3) фотолиз металлокомплексов NO.

Фотодинамическое действие на мембраны может быть опосредовано гемпорфинами и фталоцианинами, которые при облучении могут вызвать перекисное окисление мембранных липидов. Последствием перекисного окисления липидов является увеличение проницаемости мембран для H^+ и Ca^{2+} , а также может вызвать самопроизвольный «пробой» мембран. Все эти процессы приводят к повышению концентрации внутриклеточного Ca^{2+} . Биологические последствия увеличения концентрации внутриклеточного кальция зависят от вида клеток. При облучении крови может происходить предстимуляция фагоцитов, т.е. увеличение продукции активных форм кислорода в ответ на действие иммунного стимула. Малые дозы облучения стимулируют, а большие дозы подавляют активность фагоцитов.

Облучение гелий-неонового лазера способно восстанавливать активность Cu-Mn-супероксиддисмутазы, предварительно инактивированную за счет сильного закисления ($\text{pH} < 5,9$). Как известно, супероксиддисмутаза оказывает защитное действие при ишемии, ряде инфекционных болезней, действии мутагенов и токсинов. Кроме того, уменьшение концентрации супероксидного анион-радикала за счет активации супероксиддисмутазы может иметь отношение к NO-опосредованной циркуляции крови. Свободные радикалы O_2^- и $\text{NO}^\cdot$ способны к быстрой рекомбинации с образованием пероксинитрита (ONOO^-), который участвует в регуляции адгезионных свойств крови и ее микроциркуляции.

Высказывалось предположение о том, что под действием лазерного облучения из комплексов с гемсодержащими белками высвобождается NO[•] – свободнорадикальная молекула, обладающая широким спектром регуляторного действия на сосудистую систему.

Однако все предлагаемые механизмы не объясняют, почему низкоинтенсивные монохроматические источники света оказывают регуляторное действие на организм, а источники сплошного света, имеющие в своем составе идентичную по интенсивности спектральную полосу, не влияют на организм. В настоящее время к решению проблемы механизма действия низкоинтенсивного монохроматического (лазерного) излучения привлечено внимание ряда крупных исследовательских лабораторий и метод лечения, уже вошедший в медицинскую практику, наконец, получит теоретическое обоснование.

4.8. Биологические часы.

Под биологическими часами принято понимать способность организмов ориентироваться во времени. Живому организму необходимо измерять промежутки времени самой различной продолжительности и для разных целей. Без часов животные не могли бы решать задачи навигации по Солнцу или звездам. У многих растений цветение приурочено к соответствующей продолжительности светлого и темного времени суток. Таких примеров множество. Наличие внутренних часов на уровне популяции клеток демонстрирует следующий пример. Микроводоросли даже в условиях культивирования в лабораторных условиях в течение многих лет дают больший прирост численности клеток в сезон, когда в природе наблюдается вспышка их численности.

По аналогии с механическими и электронными часами, в основе работы которых лежат колебательные процессы, были сделаны попытки отождествить какие-либо метаболические колебательные процессы в клетке с обеспечением работы биологических часов. Такие процессы должен иметь период колебаний порядка нескольких секунд или десятков секунд. Одним из главных претендентов на роль своеобразного «маятника» рассматривался гликолиз. Но в ходе исследований стало ясно, что такие метаболические процессы как гликолиз может протекать по периодической кинетике только в особых условиях и сильно зависит от температуры. Кроме того, такие процессы не могут обеспечить достаточную точность «хода» биологических часов. Многие наблюдения показали, что работа биологических часов не зависит от многих внешних факторов, и, прежде всего, температуры и скоростей протекания метаболических реакций.

Биологические часы функционируют даже при почти полной остановке метаболических процессов, блокируемых ингибиторами. Например, эвглена зеленая ночью неактивна, а днем проявляет положительный фототаксис и перемещается в сторону большей освещенности для более интенсивного фотосинтеза. Ночью, если направить на сосуд с эвгленами узкий луч света, они на него не реагируют, фототаксиса не проявляют. Наступление дня и ночи зеленая эвглена определяет по своим внутренним часам. Добавление в воду с эвгленой метаболических ядов приводит к остановке движения, торможению дыхания, и гликолиза. После перенесения эвглены в свежую среду, не содержащую ядов, ее жизнедеятельность восстанавливается. При всех этих манипуляциях внутренние часы эвглены функционируют также как в контроле. Но если добавить в воду ингибиторы, блокирующие процессы считывания генетической информации, например, актиномицин Д, препятствующий функционированию РНК-полимеразы - синтезу мРНК по матрице ДНК, - биологические часы сбиваются.

Опыты Ч. Эрета показали, что в механизме биологических часов принимают участие нуклеиновые кислоты. Эрет пришел к выводу, что основа процесса отсчета времени в клетке - очень длинные молекулы ДНК, названные им «хромомами». На разошедшихся нитях спирали ДНК строится информационная РНК. Длина ее соответствует длине одиночной нити ДНК. Одновременно в клетке протекает ряд взаимосвязанных химических реакций, соотношение скоростей которых можно рассматривать как работу регулирующего механизма часов. В качестве точного механизма отсчета времени выступают последовательно происходящие реакции. Их строгая последовательность позволяет вести точный отсчет времени в широком диапазоне температур. В определенных местах хромосом есть ген *per*, определяющий циркадную периодичность. Мутации этого гена приводят к наследуемым изменениям хода часов. Гены кодируют определенные белки. Следовательно, существуют *per*-белки, определяющие ход биологических часов. Нарушение синтеза этих белков под действием различных ингибиторов останавливает часы. Синтез *per*-белка осуществляется периодически. Периодичность обусловлена тем, что по мере его синтеза по принципу обратной связи начинается торможение, ингибирование считывания - транскрипции гена. Как именно достигается эта периодичность, еще не ясно. Однако уже известно, что именно в этой системе регуляции транскрипции существуют звенья чувствительные к свету. Именно они корректируют фазу внутриклеточных часов в ответ на даже очень короткий импульс света. Как показано в работе группы авторов в 1995 году, *per*-белки обладают уникальными свойствами. Их аминокислотные цепи образуют петлю: складываются при взаимодействии аминокислот друг с другом. Но, кроме того, отдельные молекулы белка образуют димеры. Процесс внутримолекулярного взаимодействия и процесс межмолекулярного взаимодействия в точности противоположным образом зависят от температуры. В результате повышение температуры приводит к уменьшению активности одного процесса и увеличению активности другого таким образом, что итоговая "активная поверхность" белка остается постоянной. И часы идут независимо от температуры.

Таким образом, в каждой клетке животных и растений имеются гены, определяющие околосуточную (циркадную) периодичность жизнедеятельности. Внутриклеточные «часы» подстраивают свой ход к периодам смены дня и ночи – светлого времени дня и ночи – светлого и темного времени суток и мало зависят от изменения температуры. В настоящее время продолжаются исследования, направленные на выяснение конкретных механизмов реакций участвующих в работе биологических часов определенных организмов.

5. Активные формы кислорода в повреждении и защите организма

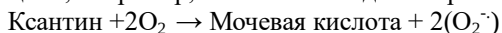
5.1. Активные формы кислорода.

Окислительное повреждение животных и растительных объектов обусловлено *активированными формами кислорода* (АФК): супероксидным анион-радикалом $O_2^{\cdot-}$, гидропероксидным радикалом $HO_2^{\cdot}$, гидроксильным радикалом $HO^{\cdot}$, а также синглетным кислородом 1O_2 и перекисью водорода H_2O_2 . Активные формы кислорода являются метаболитами, образующимися при вовлечении кислорода в обмен веществ. К АФК могут быть отнесены также *пероксильные радикалы* ($ROO^{\cdot}$) и *гидропероксиды* ($ROOH$) органических молекул.

Молекула O_2 обладает парамагнитными свойствами, которые обусловлены тем, что два электрона молекулы кислорода, находящиеся на внешних орбиталях, имеют параллельные спины. O_2 является бирадикалом с суммарным спином равным 1. Основным для молекулы O_2 является триплетное состояние (3O_2). Реакция 3O_2 с окружающими молекулами, как правило, находящимися в синглетном состоянии, требует для своего протекания дополнительной энергии. По этой причине спонтанные реакции компонентов клетки с молекулой 3O_2 затруднены, несмотря на высокий окислительно-восстановительный потенциал полного восстановления O_2 до H_2O , $E_0 = +845$ мВ. Такая ситуация благоприятна для живых организмов. Иначе в кислородной атмосфере Земли происходило бы быстрое спонтанное окисление большинства органических веществ. В биологических системах органические вещества реагируют с 3O_2 в основном при участии оксидаз, которые активируют субстрат. Очень быстро молекулы 3O_2 реагируют со свободными радикалами органических молекул, так как в этом случае снимается спиновое ограничение для протекания таких реакций. Реакции с молекулами, не обладающими свободнорадикальными свойствами, значительно ускоряются, если молекулы 3O_2 превращаются в активные формы кислорода (АФК).

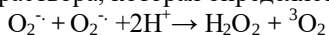
Молекулы 3O_2 растворяются в органических жидкостях значительно лучше, чем в воде (растворимость в ацетоне в 7 раз выше, а в бензоле — в 10 раз). Видимо, концентрация кислорода в липидном бислое биологических мембран выше в несколько раз, чем в контактирующих с ней водных растворах.

Супероксидный анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$) образуется, если дополнительный электрон переносится на внешнюю орбиталь молекулы O_2 . Такой перенос электрона от восстановленной нерадикальной молекулы возможен, если донор имеет окислительно-восстановительный потенциал, близкий или ниже, чем потенциал пары $O_2/O_2^{\cdot-}$. В водных растворах среднеточечного потенциала пары $O_2/O_2^{\cdot-}$ равен -160 мВ при 1 М концентрации O_2 . Эта величина должна быть использована во всех термодинамических расчетах реакций с участием $O_2^{\cdot-}$ в водных растворах. Величина среднеточечного потенциала пары $O_2/O_2^{\cdot-}$ в апротонных средах существенно ниже (от -550 до -600 мВ). Таким образом, молекулы O_2 могут быть легче восстановлены до $O_2^{\cdot-}$ в водных растворах, чем в апротонных средах, где сам $O_2^{\cdot-}$ является сильным восстановителем. В водных средах $O_2^{\cdot-}$ выступает как слабый восстановитель. Восстановление кислорода до супероксидного радикала может происходить при некоторых окислительных реакциях, например, в ксантиноксидазной реакции:



Вещества, имеющие окислительно-восстановительным потенциалом < -160 мВ, могут восстанавливать кислород в ферментативных (НАДФН-оксидаза фагоцитирующих клеток крови) и неферментативных реакциях (ферредоксин фотосинтетического аппарата).

Сильная сольватация $O_2^{\cdot-}$ обуславливает его умеренную активность в реакциях депротонирования в водных растворах. Величина рКа пергидроксильного радикала, $HO_2^{\cdot}$, равна 4.8, и в водных растворах при физиологических значениях pH количество $HO_2^{\cdot}$ чрезвычайно мало. Стабильность $O_2^{\cdot-}$ зависит от величины pH раствора, которая определяет константу скорости реакции спонтанной дисмутации:



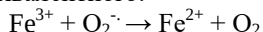
Константа этой реакции при pH 4.8 равна $10^8 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ и уменьшается до $10^5 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ при pH 7.7. При pH 11 полувремя жизни $O_2^{\cdot-}$ в водном растворе достигает 15 с.

Скорость реакции дисмутации определяет возможность включения $O_2^{\cdot-}$ в биохимические процессы. В живых клетках эту реакцию катализирует фермент супероксиддисмутаза (СОД); константа скорости ферментативной реакции в воде равна $10^9 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ и в отличие от константы скорости спонтанной дисмутации слабо зависит от pH и в нейтральных и слабощелочных средах значительно превышает ее.

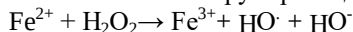
В апротонных средах дисмутация $O_2^{\cdot-}$ затруднена. В этих средах потенциальная способность супероксидного аниона присоединять протоны значительно выше, чем в водных средах. Будучи нейтральным радикалом, пергидроксильный радикал ($HO_2^{\cdot}$) способен оторвать атом водорода от субстратов с активными С-Н связями — например, от ненасыщенных жирных кислот, что может инициировать

перекисное окисление таких кислот (см. далее). Пергидроксильный радикал значительно более активен по сравнению с $O_2^{\cdot -}$ в реакции отрыва водорода от молекулы жирной кислоты и инициации этого окисления. При этом $HO_2^{\cdot}$ менее реакционноспособен, чем 1O_2 и гидроксильный радикал. Пергидроксильный радикал способен диффундировать в мембране на большие расстояния от места образования. Скорости диффузии $HO_2^{\cdot}$ через биологические мембраны значительно превосходит этот показатель для $O_2^{\cdot -}$.

Супероксидный радикал в соответствии со своим окислительно-восстановительным потенциалом (-160 мВ) способен взаимодействовать со многими соединениями. Особо следует отметить способность супероксидного анион-радикала взаимодействовать с радикалом $NO^{\cdot}$ и образовывать пероксинитрит-аниона $ONOO^-$, который обладает мощным цитотоксическим действием. Супероксидный анион-радикал может окислять адреналин до адренахрома, восстанавливать цитохром *c* и трехвалентное железо до двухвалентного:



При этом Fe^{2+} катализирует распад перекиси водорода до гидроксильного радикала:

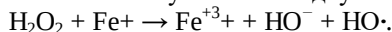


Перекись водорода является более восстановленной формой кислорода, чем супероксидный анион-радикал. Высокий положительный потенциал пары $O_2^{\cdot -}/H_2O_2$ приводит к тому, что перекись водорода легко образуется при дисмутации $O_2^{\cdot -}$. В водной среде с низким pH H_2O_2 — один из наиболее сильных химических окислителей. Однако для окисления даже хорошо подходящих по стандартным потенциалам соединений (например, аскорбата) требуется относительно высокая концентрация H_2O_2 в реакциях с участием пероксидаз. Первый одноэлектронный шаг восстановления H_2O_2 до воды приводит к образованию гидроксильного радикала $HO^{\cdot}$. Эта реакция характеризуется окислительно-восстановительным потенциалом пары $H_2O_2/HO^{\cdot}$, равным всего +300 мВ. В физиологических условиях главной мишенью окислительного действия H_2O_2 являются восстановленные сульфгидрильные группы биомолекул. Относительная стабильность

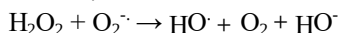
перекиси водорода позволяет ей диффундировать на значительное расстояние в клетках и биологических тканях выполняя функцию сигнальной молекулы. В водных растворах молекулы H_2O_2 образуют водородные связи с молекулами воды, и это может препятствовать их переходу из водных растворов в гидрофобные среды. Коэффициент распределения H_2O_2 между водой и бензолом равен 0.005. Диффузия H_2O_2 через биологические мембраны осуществляется, вероятно, через аквапорины — интегральные мембранных белков, формирующие каналы для небольших нейтральных молекул.

Перекись водорода способна как к окислению, так и восстановлению многих органических соединений. Она может образовываться в организме при действии некоторых оксигеназ, например, глюкозооксидазы. Разложение H_2O_2 может происходить в реакциях с каталазой и пероксидазами, например глутатиопероксидазой.

Гидроксильный радикал ($HO^{\cdot}$) возникает в клетках в основном при их распаде H_2O_2 . Такой распад катализируют ионы металлов переменной валентности в восстановленном состоянии. Реакция, в которой восстановителем выступают ионы двухвалентного железа, носит название реакции Фентона:



Распад перекиси водорода также катализируют одновалентные ионы меди, которые окисляются до двухвалентных. Окисленные ионы железа и меди могут быть ревосстановлены супероксидным радикалом, и в этом случае суммарная реакция распада H_2O_2 носит название реакции Хабера – Вайса:



В этой реакции между перекисью водорода и супероксидным радикалом образуется гидроксильный радикал. При этом прямая реакция между H_2O_2 и $O_2^{\cdot -}$ идет очень медленно. В клетке восстановление трехвалентного железа в двухвалентную форму может осуществляться и другими клеточными компонентами — прежде всего, низкомолекулярными восстановителями, такими как аскорбат.

Стандартный окислительно-восстановительный потенциал пары $HO^{\cdot}/H_2O$ равен +2300 мВ. Гидроксильный радикал является мощнейшим окислителем. Вследствие своей высокой реакционной способности, $HO^{\cdot}$ реагирует со скоростями, зависящими только от скорости его диффузии. Гидроксильный радикал способен окислять практически все связи в биомолекулах, и поэтому в клетке он вступает в реакцию в месте своего образования. Время жизни гидроксильного радикала в клетке не превосходит 10^{-8} с.

Пероксильные радикалы ($ROO^{\cdot}$) и гидропероксиды ($ROOH$) органических молекул также могут быть отнесены к АФК. В биологических системах основное внимание обычно уделяется перекисному окислению жирных кислот. Этот процесс инициируется в ненасыщенной жирной кислоте отрывом атома водорода от атома углерода, соседнего с углеродами, между которыми существует двойная связь, что приводит к появлению радикала $R^{\cdot}$. Окисление жирной кислоты в реакциях с $HO^{\cdot}$, 1O_2 и $O_2^{\cdot -}/HO_2^{\cdot}$ обычно рассматривается как основной путь возникновения $R^{\cdot}$, однако оно может происходить и в реакции с другими окислителями. В физиологических условиях реакция $R^{\cdot}$ с молекулой O_2 протекает с высокой вероятностью. Образовавшийся радикал $ROO^{\cdot}$ достаточно активен, чтобы в гидрофобном матриксе мембраны акцептировать атом водорода от другой ненасыщенной жирной кислоты. При этом образуются

гидропероксид ROOH и новый R·, что приводит к цепному перекисному окислению липидов (ПОЛ). Гидропероксиды липидов — обычные интермедиаты и продукты многих клеточных процессов. Инициация ПОЛ может происходить и при восстановлении имеющихся в мембране ROOH, например, ионами двухвалентного железа; при этом образуется RO·, алкоксильный радикал, который способен акцептировать атом водорода от жирной кислоты с образованием спирта ROH и нового R·.

Синглетный кислород образуется при обращении спина одного из неспаренных электронов молекулы $^3\text{O}_2$. Синглетный кислород значительно более активно реагирует с многими органическими молекулами, чем триплетный. В результате таких реакций в клетке возникают пероксиды органических молекул, а некоторые молекулы разрушаются. Известны две формы синглетного кислорода: $^1\text{Z}_g\text{O}_2$ с энергией 155 кДж/моль и $^1\Delta_g\text{O}_2$ с энергией 97 кДж/моль. В первом случае два электрона с антипараллельными спинами находятся на разных орбиталях молекулы кислорода, а во втором — на одной орбитали. Форма $^1\text{Z}_g\text{O}_2$ нестабильна и в воде за 10^{-11} - 10^{-12} с превращается в форму $^1\Delta_g\text{O}_2$. Таким образом, в биологических системах в реакциях участвует только форма $^1\Delta_g\text{O}_2$. Переход из $^1\text{O}_2$ в $^3\text{O}_2$ происходит сравнительно медленно. Время жизни кислорода в состоянии $^1\Delta_g\text{O}_2$ в водной среде составляет 3.9 мкс. В средах, менее полярных, чем вода, время жизни больше — 12 мкс в этаноле и 24 мкс бензоле, а в тяжелой воде это время увеличивается до 68 мкс (Krasnovsky, 1998). Оценки полувремени жизни синглетного кислорода в клетке варьируют от 0.2 мкс до 3 мкс. В различных компартментах клетки это время может значительно различаться. В липидной фазе мембраны время жизни синглетного кислорода составляет около 7 мкс.

Синглетный кислород способен окислять многие ненасыщенные соединения, образуя гидропероксиды и диокситаны. Он может встраиваться внутрь гетероциклических и бензольных колец, образуя эндопероксиды. Такие продукты образуют многие ароматические углеводороды (9,10-дифенилантрацен, тетрацен, рубрен), гетероциклические соединения (2,5-диметилфуран, фурфуроловый спирт, имидазол) и олефины (холестерин).

Генерация активных форм кислорода может происходить в аэробных условиях при облучении светом фотодинамических красителей, как правило, с участием триплетных состояний красителя по следующим механизмам:

1. $^3\text{K} + \text{RH} \rightarrow \text{K}^{\cdot-} + \text{R}^{\cdot+}$
 $\text{K}^{\cdot-} + \text{O}_2 \rightarrow \text{K} + \text{O}_2^{\cdot-}$
2. $^3\text{K} + \text{O}_2 \rightarrow \text{K} + ^1\text{O}_2$
3. $^3\text{K} + \text{O}_2 \rightarrow \text{K}^+ + \text{O}_2^{\cdot-}$

(где K — фотодинамический краситель, RH- субстрат фотоокисления).

Многие синтетические и природные красители, например метиленовый синий, бенгальский розовый, эозин, протопорфирин, фурукумарины, антрахинон, хлорофилл и др. при облучении в аэробных условиях с высокой квантовой эффективностью генерируют синглетный кислород. В таблице 2 приведены лекарственные средства, обладающие фотодинамическим действием.

Группа лекарственных средств	Препараты
Антимикробные средства	Амоксициллин Гризеофульвин Доксициклин Миноциклин Окситетрациклин Сульфаниламиды Тетрациклин Триметоприм
Нестероидные противовоспалительные средства (НПВС)	Диклофенак Ибупрофен Индометацин Пироксикам Фенбуфен Фенилбутазон
Антидепрессанты	Амитриптилин Флуоксетин
H ₁ - и H ₂ -блокаторы	Ранитидин Циметидин
Гипотензивные средства	Метилдопа Миноксид Нифедипин

5.2. Влияние АФК на биологические системы

Каждая из АФК, как было показано выше, способна продуцировать другие формы. Так, появление супероксидного анион-радикала или перекиси водорода приводит к образованию всех остальных АФК. $\text{O}_2^{\cdot-}$ и

H_2O_2 не очень опасны в отношении окислительного повреждения жизненно важных структур клетки в отличие от HO^* и 1O_2 , которые приводят к окислительному повреждению с высокой эффективностью и обладают чрезвычайно высокой цитотоксичностью. Как было отмечено выше, для образования супероксидного анион-радикала нужен донор электронов с высоким отрицательным окислительно-восстановительным потенциалом. Такими свойствами в клетке обладают восстановленные компоненты системы транспорта электронов в процессе аэробного дыхания и фотосинтеза. В нормальных условиях генерация АФК протекает на относительно низком уровне. Это происходит за счет малого времени жизни восстановленных переносчиков электронов, присутствию в организме мощных систем защиты от АФК и репарационным процессам, полностью компенсирующим возможные повреждения биологических структур. Однако в случаях патологических нарушений нормального функционирования организма, вызываемых различными причинами, происходит ускорение генерации АФК. Такие разные заболевания человека как ишемические повреждения, нейродегенеративные заболевания, злокачественное перерождение клеток сопровождаются ускоренной генерацией АФК.

5.3. Повреждение ДНК с участием АФК.

Молекула ДНК может повреждаться при взаимодействии с HO^* и в гораздо меньшей степени с $O_2^{\cdot-}$. Радикалы, образующиеся при перекисном окислении липидов, также способны повреждать молекулы ДНК. Гидроксильный радикал может действовать на пуриновые и пиримидиновые основания, а также на остатки рибозы и дезоксирибозы. Супероксид-анион обладает избирательным действием, взаимодействуя с гуаниновыми основаниями с образованием 7,8-дигидро-8-гидроксигуанозин. Синглетный кислород в нуклеиновых кислотах окисляет 4-тиоуридин и гуанозин, тогда как другие нуклеотиды не подвержены такому действию. Свободнорадикальное окисление липидов приводит к нарушению проницаемости мембран и повышению концентрации внутриклеточного кальция, что в свою очередь приводит к активации эндонуклеаз и повреждению ДНК.

5.4. Повреждение белков с участием АФК.

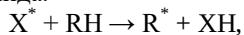
В условиях усиленного образования активных форм кислорода происходит окислительная модификация белков. Свободные радикалы атакуют белки по всей длине полипептидной цепи, нарушая не только первичную, но и вторичную, и третичную структуру белков, что может приводить к агрегации или фрагментации белковой молекулы. Многие ферменты, содержащие SH-группы, такие как АТФ-азы или дегидрогеназы, легко окисляются в результате свободнорадикальной атаки.

В белках и пептидах основной мишенью синглетного кислорода являются следующие аминокислотные остатки: гистидин, метионин, цистин, триптофан, тирозин и фенилаланин. Наиболее распространенный тип повреждения белков - образование карбонильных групп при окислении лизина, аргинина и пролина. Карбонильные группы могут взаимодействовать с аминокислотными группами, образуя шиффовы основания. В конечном счете, этот процесс приводит к образованию сшивок между белковыми молекулами и нарушению их нативного состояния.

Если в состав белка входит простетическая группа, содержащая металлы переменной валентностью, то в присутствии перекиси водорода образуется HO^* . При этом гидроксильный радикал окисляет аминокислоты в активном центре фермента, что может привести к потере его ферментативной активности.

5.5. Перекисное окисление липидов.

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) — окислительная дегградация ненасыщенных липидов, происходящая, в основном, по свободнорадикальному механизму. Родоначальниками этих исследований в начале шестидесятых годов прошлого века были Б.Н.Тарусов и Н.М.Эмануэль. Свободнорадикальное окисление липидов на начальном этапе предполагает реакцию инициирования, в которой ненасыщенный липид взаимодействует со свободными радикалами каких-либо веществ, в частности со свободнорадикальными формами кислорода. В результате инициирования образуется свободный радикал липида.

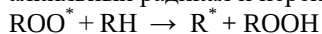


где X^* - свободный радикал какого-либо соединения, RH – неокисленный липид, R^* - алкильный радикал липида, XH – неактивное соединение.

Присоединение к алкильному радикалу липида кислорода приводит к образованию перекисного радикала:

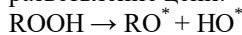
$$R^* + O_2 \rightarrow ROO^*.$$

В свою очередь, перекисный радикал при взаимодействии с новой молекулой липида может образовать алкильный радикал и перекись липида:

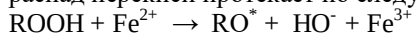


Последние две реакции продолжают цепь превращений свободных радикалов.

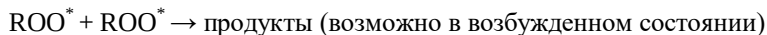
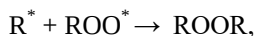
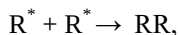
Перекись липида может в результате распада образовать два свободных радикала, когда происходит разветвление цепи:



Распад ROOH может быть катализирован ионами переменной валентности. В случае катализа железом распад перекиси протекает по следующей реакции:



В процессе ПОЛ возможно несколько путей обрыва цепи свободнорадикальных реакций:



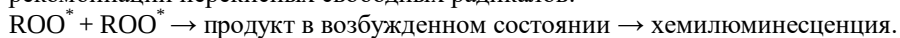
Важной особенностью перекисного окисления липидов является их цепной характер, вследствие чего, раз начавшись, этот процесс поддерживает сам себя, поскольку образующиеся липидные радикалы инициируют новые центры активации окисления.

Возможно ингибирование свободнорадикальных реакций антиоксидантами. Механизм действия наиболее распространенных антиоксидантов (ароматические амины, фенолы, нафтолы и др.) состоит в обрыве реакционных цепей: молекулы антиоксиданта взаимодействуют с активными радикалами с образованием малоактивных радикалов. Окисление может замедляться также в присутствии веществ, разрушающих гидроперекиси и снижающих скорость образования свободных радикалов из них. Даже в небольших концентрациях (1—10 мкМ) антиоксиданты уменьшают скорость окисления, поэтому в течение некоторого периода времени (период торможения, индукции) продукты окисления не обнаруживаются.

Процесс ПОЛ является важной причиной накопления клеточных дефектов. Продукты ПОЛ увеличивают проницаемость биологических мембран и нарушают их транспортные функции. Прежде всего, это касается проницаемости мембран для ионов кальция и протонов. Продукты ПОЛ снижают электрическую стабильность мембран и могут приводить к «самопробою» мембраны за счет собственного электрического потенциала.

Перекиси полиненасыщенных липидов (диеновые и триеновые конъюгаты) могут быть обнаружены по спектрам поглощения в УФ-области спектра. Диеновые конъюгаты имеют максимум спектра поглощения при 233 нм, а триеновые конъюгаты – 270-280 нм. При окислительной дегградации полиненасыщенных липидов образуется альдегиды: гидроксинафтален и малоновый диальдегид (МДА) - $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$ соединения, взаимодействующие с аминогруппами различных соединений с образованием продуктов, нарушающих нормальное функционирование клеток. Показано, что МДА может реагировать с ДНК, образуя ДНК-аддукты. МДА также может взаимодействовать с белками и азотсодержащими липидами с образованием шиффовых оснований. МДА вступает в реакцию с тиобарбитуровой кислотой, образуя красный флуоресцирующий продукт с максимумом спектра поглощения при 532 нм, что позволяет проводить спектрофотометрический и/или флуориметрический анализ содержания МДА. Шиффовы основания являются основным компонентом «пигментов старения». Эти пигменты накапливаются в липидной фазе и жировой ткани. Их количество растет с возрастом животного. Особенно интенсивно пигменты старения накапливаются в неблагоприятных условиях, приводящих к перекисному окислению липидов. Аналогичные пигменты образуются и в стареющих тканях растительных организмов. По накоплению «пигментов старения» можно судить об интенсивности окислительного повреждения, которым подвергался данный организм.

Перекисное окисление липидов сопровождается хемилюминесценцией, которая возникает при рекомбинации перекисных свободных радикалов:



Хемилюминесценция, сопровождающая перекисное окисление липидов, имеет очень низкий квантовый выход. Тем не менее, высокоэффективные счетчики фотонов позволяют детально исследовать кинетику данного процесса и влияние на него различных веществ, способных тормозить или ускорять процесс окисления липидов. Использование ряда физических активаторов хемилюминесценции, таких как протопорфирин IX, комплекс европия с тетрациклином, родамин G и некоторые производные кумаринов, позволяет значительно повысить чувствительность определения интенсивности перекисного окисления липидов в живых клетках.

5.6. Защита организма от окислительного повреждения

Человек в покое вдыхает около 280 мл O_2 /мин, или 400 л в сутки, что соответствует 18 молям O_2 и около 2-5% от этого количества переходит в активные формы кислорода. Стационарная концентрация активных форм кислорода в тканях, как правило, не превосходит 10^{-8} М. Защитные системы клетки в нормальных условиях предотвращают неконтролируемое окислительное повреждение организма. Патологические последствия возникают в организме в случае чрезмерной генерации активных форм кислорода и/или недостаточной активности защитных систем.

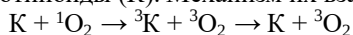
Одним из наиболее эффективных факторов защиты от опасности окисления является низкая концентрация кислорода в клетке. Терминальные оксидазы дыхательной цепи имеют очень высокое сродство к кислороду. Их константа Михаэлиса меньше, чем 10^{-6} М. В то же время процессы образования O_2^- – неферментативный процесс, который протекает при значительно более высоких концентрациях кислорода

около 10^{-4} М. У животных снижение вентиляции легких и сужение кровеносных сосудов при переходе от состояния активности к покою можно рассматривать как физиологический ответ организма, предотвращающий повышение концентрации кислорода и защищающий его от окислительного повреждения.

Нарушение работы дыхательной и фотосинтетической системы электронного транспорта, приводящее к избыточному количеству восстановленных продуктов и увеличению их времени жизни в восстановленном состоянии, создают условия для восстановления кислорода до супероксидного анион-радикала, усиленной генерации АФК и окислительному повреждению. Так торможение дыхания в митохондриях не только приводит к повышению концентрации кислорода, но и к повышению степени восстановления флавинов, коэнзима Q и негемовых железопротеинов, то есть основных поставщиков электронов для одноэлектронного восстановления кислорода. Окислительное повреждение затрагивает все главные макромолекулярные и структурные элементы клетки: нуклеиновые кислоты, белки и мембранные липиды.

Все аэробные организмы в благоприятных для них условиях хорошо защищены от АФК несколькими защитными системами. Ряд ферментных систем участвует в защите клеток от действия АФК. Супероксиддисмутаза уничтожает супероксидные анион-радикалы путем дисмутации по следующей схеме: $O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + {}^3O_2$. Константа скорости этой реакции очень велика ($10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Супероксиддисмутазы были обнаружены у всех аэробных организмов. Существует множество изоформ этого фермента. Их простетические группы могут содержать медь, марганец, цинк или железо. Чрезвычайно высокой супероксиддисмутазной активностью обладают эритроциты. Эта активность обусловлена медьсодержащим ферментом, составляющим значительную часть белков эритроцита. Ранее этот белок назывался эритрокупреином. В эритроцитах локализована высокая активность каталазы, которая разлагает продукт деятельности супероксиддисмутазы - H_2O_2 до воды и кислорода. В других клетках в утилизации H_2O_2 могут принимать участие пероксидазы, например, глутатионпероксидаза. Таким образом, основными путями снижения концентраций $O_2^{\cdot -}$ и H_2O_2 являются ферментные системы присущие всем аэробным организмам.

Малое время жизни и высокая реакционная способность 1O_2 и $HO^{\cdot}$ не совместимы с избавлением от этих частиц за счет ферментативного катализа. Для защиты от 1O_2 и $HO^{\cdot}$ в клетках животных и растений присутствуют вещества, тормозящие протекание окислительных процессов – *антиоксиданты*, такие как α -токоферол, фенольные соединения, меланины. Кроме того, в клетках присутствуют тушители синглетного кислорода. Наиболее эффективными физическими тушителями синглетного кислорода являются каротиноиды (К). Механизм их взаимодействия с синглетным кислородом приведен ниже:



Константа скорости тушения в этой реакции близка к константе диффузии ($3 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Некоторые антиоксиданты, такие как α -токоферол, также являются хорошими тушителями синглетного кислорода, (константа скорости тушения $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Даже наличие мощной системы защиты от активных форм кислорода не может полностью предотвратить развитие окислительного повреждения жизненно важных структур в неблагоприятных для организма условиях. Когда защитные возможности организма по ограничению генерации АФК недостаточны, происходит окислительное повреждение организма.

5.7. ПОЛ субклеточных мембранных структур растений

Окислительное повреждение растений может сопровождаться ПОЛ или является его причиной. У растений окислительная деградация липидов, может протекать разными путями, в том числе, и с участием липоксигеназы. Однако, действие липоксигеназы ограничено свободными жирными кислотами, ди- и триацилглицеридами. Значительно менее эффективен этот фермент в отношении полярных липидов и липидов в составе мембран. Физиологическая роль липоксигеназы до сих пор дискутируется. Долгое время оставалось не ясным, является ли липоксигеназный путь единственным ферментативным способом ПОЛ. В тканях животных образование перекисей липидов обусловлено, главным образом, ферментативной НАДФ-Н-зависимой системой ПОЛ. Эта система локализована в мембранах эндоплазматического ретикулума и функционирует в присутствии двухвалентного железа. Мембраны эндоплазматического ретикулума растений имеют схожий состав ферментов, катализирующих гидроксилирование ксенобиотиков. Пиридиннуклеотиды в восстановленном состоянии могут индуцировать ПОЛ в мембранах эндоплазматического ретикулума растительных клеток.

Добавление в суспензию микросом, выделенных из зеленых листьев и этиолированных проростков гороха, НАДН или НАДФН в присутствии Fe^{2+} +АДФ увеличивало скорость образования одного из продуктов ПОЛ – малонового диальдегида. ПОЛ, индуцированное восстановленными пиридиннуклеотидами, сопровождается увеличением содержания перекисей полиненасыщенных жирных кислот и ускоренным образованием флуоресцирующих липофусциноподобных продуктов, представляющих собой преимущественно шиффовы основания.

В хлоропластах также протекают процессы ПОЛ, вызванные восстановленными пиридиннуклеотидами. По сравнению с микросомами этот процесс протекает менее интенсивно. По скоростям накопления МДА в суспензии хлоропластов эффекты пиридиннуклеотидов сопоставимы с

действием известного индуктора ПОЛ - системы железо-аскорбат. Функциональные показатели состояния ФСА хлоропластов при инкубации с ферментативными индукторами ПОЛ практически не отличались от контрольных.

Инкубация хлоропластов с индукторами супероксидного анион-радикала (система ксантин – ксантиоксидаза) не было обнаружено продуктов ПОЛ. Видимо, это обусловлено тем, что генерация АФК, способных вызывать ПОЛ, происходит в водной фазе и не затрагивает мембранных структур хлоропластов. При индукции ПОЛ пиридиннуклеотидами или аскорбатом процесс окисления развивается непосредственно на мембранах хлоропластов. Однако, несмотря на это ферментативное ПОЛ не вызывает изменений функционального состояния ФСА. Возможно, пиридиннуклеотиды и аскорбат, являясь восстановителями, могут защитить ФСА, предотвращая возможное окисление сульфгидрильных групп белков или принимая участие в работе ЭТЦ. Но более вероятно, что процессы, индуцированные ферментными системами, вызывают ПОЛ на внешней мембране хлоропластов и практически не затрагивают фотосинтетических тилакоидных мембран вблизи реакционных центров. Кроме того, тилакоидные мембраны, видимо, обладают мощной ферментативной и антиоксидантной защитой от АФК и развития ПОЛ. Эффективность окислительного повреждения ФСА за счет процессов протекающих вне фотосинтетических мембран чрезвычайно низка. Видимо, повреждение ФСА может происходить только при индукции ПОЛ фотосинтетических мембран в непосредственной близости от РЦ за счет процессов индуцированных светом. ПОЛ индуцированный светом мембран тилакоидов хлоропластов, вызывает накопление МДА, деградацию НЖК, окислительную деградацию пигментов и другие изменения. Однако эти изменения липидов и пигментного аппарата наблюдали на глубоких стадиях повреждения хлоропластов, когда фотосинтетическая ЭТЦ была полностью инактивирована.

5.8. ПОЛ при действии гербицидов и старении растений.

При старении в органах и тканях животных и растений накапливаются липофусциновые пигменты, обладающие характерной люминесценцией в видимой части спектра. Образование этих продуктов наблюдается на ранних этапах старения листьев, когда не происходит заметной потери тургора, а количество разрушенного хлорофилла не превышает 10% от его содержания в контрольных листьях. Следует отметить, что в процессе старения листьев растений гороха не происходит увеличения в них содержания МДА. Можно предположить, что в тканях растений МДА с высокой скоростью расходуется, в том числе и на образование флуоресцирующих продуктов.

Влияние ряда гербицидов на растения может быть обусловлено окислительным повреждением и в большой степени фотоиндуцированным перекисным окислением мембранных липидов. В литературе представлено много данных о закономерностях протекания ПОЛ высших растений и водорослей под действием гербицида - диквата (бромистый 1,1'-этилен-2,2'-дипиридилий). Известно, что это соединение восстанавливается за счет переносчиков ЭТЦ и передает электрон на кислород с образованием супероксидного анион-радикала. В хлоропластах дикват выступает эффективным переносчиком электронов с акцепторной части ФС1 на кислород.

Обработка растительных объектов дикватом приводит к накоплению МДА. Параллельно этому происходит деградация пигментов и изменение жирнокислотного состава липидов. Деградация хлорофиллов протекает несколько медленнее деградации каротиноидов.

При действии диквата и его аналога метилвиологена значительно увеличивается средняя скорость фотовыцветания под действием света высокой интенсивности. При этом распределения по скоростям фотовыцветания различных участков мезофилла, измеренная микрофотометрическим способом, значительно изменяются. В контроле распределение близко к распределению Гаусса. При действии метилвиологеном значительно возрастают дисперсия и эксцесс распределения, а отношение стандартного отклонения к среднему при действии метилвиологена выше, чем в контроле. Видимо, это обусловлено разной чувствительностью клеток к действию метилвиологена. Исходно гомогенный «ансамбль» клеток расщепляется под действием метилвиологена на группы резистентных и чувствительных к фотоповреждению клеток.

Известно, что галоидфеноксиуксусной 2,4-дихлорфеноксиуксусной (2,4-Д) и 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной (2,4,5-Т) (соединения по химическому строению близкие к некоторым фитогормонам) нарушают гормональный баланс растений. Такой механизм действия данных гербицидов не предполагает прямого влияния этих веществ на процессы ПОЛ. Галоидфеноксиуксусные кислоты индуцируют ПОЛ в мембранных структурах, как зеленых, так и этиолированных растений. Основные закономерности этого процесса близки к эффектам действия на растения индуктора $O_2^{\cdot -}$ - диквата, но несколько отсрочены по времени. В тоже время добавление 2,4-Д к изолированным хлоропластам растений не приводит к накоплению продуктов ПОЛ. В связи с этим ПОЛ, индуцированное галоидфеноксиуксусными кислотами, по-видимому, обусловлено непрямым действием на ФСА растений.

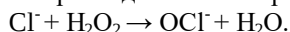
Таким образом, окислительное повреждение ФСА растений может быть инициировано за счет генерации АФК при непосредственном воздействии на компоненты ЭТЦ. Нарушения метаболических процессов прямо не связанных с образованием АФК могут вызывать окислительное повреждение ФСА

оказывая опосредованное влияние на состояния фотосинтетической ЭТЦ. При этом нарушение функционирования системы электронного транспорта приводит к окислительному повреждению ФСА, видимо, протекающему по тому же сценарию, что и при прямом действии веществ ускоряющих генерацию АФК.

5.9. Роль АФК в реакциях иммунитета.

На протяжении длительного времени в биологической литературе рассматривали в основном вредные эффекты действия АФК на нуклеиновые кислоты, белки и липиды. Исследованиями последних десятилетий показано, что АФК принимают участие в защите организма от многих неблагоприятных внутренних и внешних факторов. С участием АФК протекают такие важные процессы как апоптоз, иммунный ответ на внедрение чужеродных частиц, удаление ксенобиотиков. Показано, что некоторые из АФК могут выполнять регуляторные функции в организме.

Известно, что фагоцитирующие клетки человека и животных способны генерировать АФК в целях защиты от инфекций. По сигналу о начале фагоцитоза инородной частицы на внешней стороне цитоплазматической мембраны фагоцитирующей клетки за счет окисления внутриклеточного НАДФН происходит восстановление кислорода до $O_2^{\cdot -}$ и, вслед за тем, всех АФК. Кроме того, в присутствии миелопероксидазы ион хлора взаимодействует с перекисью водорода с образованием гипохлорида:



Гипохлорид является бактерицидным веществом, которое применяют для обеззараживания и отбеливания. Таким образом, весь комплекс реакций, протекающих вблизи внешней мембраны фагоцитирующей клетки, направлены на инактивацию чужеродной частицы, которая может быть бактерией или вирусом. В итоге в фагоцитирующую клетку (нейтрофил или макрофаг), в ее фагосому, а затем фаголизосому должны попадать уже инактивированные частицы. Однако возбудители ряда инфекционных заболеваний обладают высокой устойчивостью к действию АФК и сохраняют нативность при попадании в клетки иммунной системы.

Как известно, в отличие от животных растительный организм не имеет специализированных клеток, ответственных за иммунитет. У растений все клетки способны защищаться от внешней инфекции по одному из двух вариантов. Растение допускает распространение патогена, что может привести к его гибели, или растение воспринимает сигнал об атаке патогена и включает генетически запрограммированную систему защиты. Эта защита направлена на ограничение распространения инфекции, повышение иммунитета растения в целом и избавление от инфекции. Атака патогена распознается рецепторами, находящимися в плазмолемме растительной клетки. Вещества, которые побуждают защитные ответы у растений, называются *элиситорами*. Связывание рецептора с элиситором приводит в действие генетически запрограммированную систему защиты растения. Часто программа защиты приводит к *реакции сверхчувствительности*, которая заключается в возникновении некрозов и гибели клеток в зоне внедрения патогенного организма. Так растение препятствует распространению патогену. Одновременно с реакцией сверхчувствительности во всем растении происходит повышение устойчивости к патогену путем активации синтеза веществ, обладающих фунгицидными и бактерицидными свойствами, а также укрепление клеточных стенок за счет дополнительного синтеза лигнина. Все эти процессы обусловлены экспрессией ряда ранее «молчавших» генов. При этом начинается синтез так называемых PR (Pathogenesis-related) белков, к которым относятся хитиназы и глюканазы, разрушающие клеточные стенки грибов и бактерий, а также ферменты, участвующие в синтезе растительных антибиотиков – фитоалексинов.

В реакции сверхчувствительности участвует ряд сигнальных молекул – перекись водорода, NO, салициловая и жасминовая кислоты. Совместное действие этих соединений индуцирует реакцию сверхчувствительности растений. Видимо, каждое из перечисленных соединений запускает свой каскад реакций. При этом ведущую роль в индукции реакции сверхчувствительности, по-видимому, принадлежит перекиси водорода.

Взаимодействие элиситора патогена с рецептором на плазмолемме запускает пути сигнальной трансдукции, приводящей к синтезу NO и активацию НАДФН-оксидазы в зоне внедрения патогена. Первой реакцией растения на атаку патогена является *окислительный взрыв* – интенсивное поглощение кислорода в реакциях образования супероксидного анион-радикала и продукта его дисмутации - перекиси водорода. Образование супероксида происходит в результате действия НАДФН-оксидазы и пероксидазы клеточной стенки. Клеточная стенка растений является рыхлым пекто-целлюлозным образованием, включающим в себя пероксидазу. Причем большая часть пероксидазной активности растительной ткани приходится на клеточную стенку. Совместное действие NO и перекиси водорода запускают программируемую гибель клеток. Если в зоне некроза происходит локальная гибель клеток, то у более удаленных тканей растения под действием более низких концентраций перекиси водорода индуцируется системная устойчивость. Кроме того, в случае повреждении плазмолеммы патогеном вещества фенольной природы выходят из клетки и вступают в реакцию с пероксидазой, в которой происходит генерация АФК. При этом фенолы окисляются до хинонов, которые обладают значительно большей цитотоксичностью, чем соответствующие фенолы. Так в зоне взаимодействия паразита с клеткой происходит инактивация паразита.

Взаимодействия растения-хозяина с паразитом можно проиллюстрировать на вилте хлопчатника, который вызывает гриб *Fusarium oxysporum*. Известно, что хлопчатник накапливает фитоалексин –

госсипол, который повышает его устойчивость к вилту. Госсипол – фенольное соединение, способное при участии пероксидазы образовывать супероксидный анион-радикал и другие АФК. Система госсипол + пероксидазная оказывается токсичной для возбудителя вилта. Добавление в систему супероксиддисмутазы, удаляющей из системы $O_2^{\cdot-}$, полностью устраняет токсические эффекты для возбудителя вилта. Из этого следует, что токсическим фактором для гриба *Fusarium* является $O_2^{\cdot-}$ и/или другие АФК.

Сравнение двух различающихся по агрессивности штаммов гриба *Fusarium oxysporum* показало, что более агрессивный штамм накапливал в клетках каротиноиды (известные тушители синглетного кислорода) и имел более активные ферменты СОД и каталазу по сравнению с менее агрессивным штаммом.

На срезах клубня, а затем на высечках листьев картофеля было зарегистрировано взрывное усиление продукции супероксидного радикала после заражения зооспорами *Phytophthora infestans*, более сильное в несовместимой комбинации. Индукторами окислительного взрыва были элиситоры клеточной стенки гриба, а зависимость этого явления от устойчивости хозяина определяли супрессоры, тоже грибные. Те же закономерности выявлены на двудольных растениях при многих грибных, бактериальных и вирусных болезнях. В настоящее время не вызывает сомнения, что окислительный взрыв – одно из самых ранних проявлений устойчивости растений.

Паразиты растений используют супероксиддисмутазу, каталазу и другие ферменты для снижения скорости окислительных процессов и сохранения своей активности при взаимодействии с хозяином. Многие фитопатогенные организмы содержат меланины. На ряде примеров, в частности, на грибах показано, что присутствие меланинов делает клетки устойчивыми к самым разным экстремальным воздействиям. Мутации паразитических грибов, приводящие к блокированию синтеза меланинов, лишают их способности к паразитизму.

5.10. Защита организма от ксенобиотиков и система цитохромов Р450.

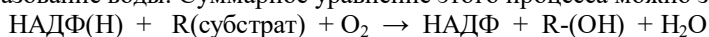
Ксенобиотики – это чужеродные для организма вещества. Такие вещества всегда присутствуют в природной среде и живые организмы имеют защиту от этих веществ, но промышленная революция привела к непрерывно растущему загрязнению среды различными синтетическими веществами, с которыми защитные системы не всегда могут справиться. Ксенобиотики способны повреждать клетки, вызывать мутации и могут быть причиной онкологических заболеваний человека. Загрязнение среды ксенобиотиками является одной из серьезнейших угроз Человечеству и всей жизни на Земле. В давней истории имеется прецедент, когда чужеродные вещества способствовали социальной катастрофе глобального масштаба. Гибель Римской империи сейчас связывают не только с экономическими и политическими факторами, но и со свинцовой интоксикацией элиты общества. Римляне широко использовали свинцовые водопроводы, а в состав парфюмерии того времени входили высокотоксичные свинцовые белила. В костях знатных римлян обнаружены очень высокие концентрации свинца.

В организме происходит метаболизм ксенобиотиков. Он, как правило, приводит к снижению их активности – *дезактивации*, которая в случае токсических веществ называют *детоксикацией*. В метаболизме ксенобиотиков задействовано около 30 ферментов, которые принимают участие в двух стадиях: модификации, создающей или освобождающей функциональные группы, и конъюгация – присоединение к ним других групп или молекул. Затем модифицированный ксенобиотик должен быть выведен из клеток и организма.

Реакция модификации ксенобиотиков может происходить путем введения в неполярную молекулу полярной группы. Однако в некоторых случаях в результате такой модификации могут появляться биологически активные молекулы. Наиболее распространенные типы модификации являются: гидроксילирование, введение эпоксидной группы, образование сульфоксидов, дезалкилирование, дегалогенирование. Другим типом модификации ксенобиотиков является конъюгация. Типичным примером конъюгации является присоединение к молекуле ксенобиотика глюкуроновой кислоты. Получаемая в результате такой конъюгации молекула имеет высокую полярность.

Для первой стадии модификации ксенобиотиков наиболее важной является система цитохромов Р450. Цитохромы Р450 представляют собой группу ферментов, катализирующих окисление широкого спектра липофильных соединений. Изоформы цитохромов Р450, количество которых превышает сотню, различаются по субстратной специфичности, по типам гидроксилируемых или расщепляемых химических связей и по образуемым продуктам.

Они обнаружены у всех живых организмов за исключением анаэробных микроорганизмов. Цитохромы Р450 являются терминальным компонентом монооксигеназной ферментной системы, локализованной в мембранах эндоплазматической сети клетки. Основная функция цитохромов Р450 – присоединение к молекуле ксенобиотика гидроксильной группы. Гидроксילирование субстратов происходит за счет восстановленных пиридиннуклеотидов с участием флавинов и цитохрома b₅. При этом донором восстановительных эквивалентов служит НАДФ(Н), а второй атом кислорода расходуется на образование воды. Суммарное уравнение этого процесса можно записать следующим образом:



Таким путем организм избавляется от бензола, фенола, полициклических углеводов, барбитуратов и многих других соединений тем или иным путем попавших в организм.

На второй стадии модификации ксенобиотиков происходит увеличение гидрофильности и снижение токсичности метаболитов. На этой стадии основной реакцией является конъюгация промежуточного

продукта с восстановленным глутатионом при участии глутатионтрансфераз. Ставшие гидрофильными и менее токсичными продукты метаболизма ксенобиотиков выводятся в вакуоли клеток или поступают в плазму крови и удаляются из организма почками или при молекулярной массе выше 300 печенью в составе желчи. Выделение из клеток ксенобиотиков может происходить и за счет функционирования Р-гликопротеина, который является транспортной АТФазой.

Функционирование системы метаболизма ксенобиотиков обеспечивает обезвреживание десятков тысяч чужеродных для организма веществ различного химического строения. Однако система цитохромов Р450 превращает некоторые ксенобиотики в более вредные соединения. Например, хлороформ превращается в боевое отравляющее вещество фосген, парацетамол в метаболит токсичный для печени и почек, а пирен в канцерогенный продукт дигидроксиэпоксид.

Системы цитохромов Р450 обладают кислород-активирующей функцией, позволяющей внедрять кислород в состав различных субстратов. Активация кислорода цитохромом Р450 несет в себе потенциальную опасность. Многие реакции, катализируемые цитохромом Р450, могут за счет высвобождения активированных форм кислорода вызывать перекисное окисление липидов, приводить к инактивации ферментов и других макромолекул.

Системы метаболизма ксенобиотиков в отсутствие чужеродных веществ обладают относительно низкой активностью. Появление в организме ксенобиотиков приводит к многократному повышению активности этой, локализованной на мембранах цитоплазматической сети, ферментной системы. Индукция системы метаболизма ксенобиотиков приводит к тому, что чужеродные вещества быстрее выводятся из организма. Например, снотворное действие фенobarбитала при его длительном применении снижается в силу того, что он все быстрее выводится из организма.

Уровень активности монооксигеназного окисления выше в тканях человека и теплокровных животных, ниже в тканях рыб, и очень низок в растениях. Можно говорить и о видовой специфичности активности монооксигеназ. Так, например, активность монооксигеназ гепатоцитов птиц убывает в ряду: перепел > пустельга > голубь > цапля > чайка. В таблице 6 приведены содержания цитохрома Р-450 и активности монооксигеназ, измеренные по скорости гидроксирования бенз(а)пирена, в микросомах различных видов рыб, птиц и млекопитающих, в норме и в результате индукции монооксигеназ метилхолантеном (МХ).

Табл.6. Содержание цитохромов Р-450 и В₅ в микросомной фракции печени рыб озера Байкал и некоторых птиц в норме и после введения им индуктора монооксигеназ метилхолантрена (МХ). (по данным С.В. Котелевцева)

Вид рыбы	Цит. Р-450 (рмоль • мг ⁻¹ белка микросом)	Активность Бенз(а)пирен- гидроксилазы (рмоль • мг ⁻¹ белка микросом мин ⁻¹)	Активность бенз(а)пиренгидроксилазы после индукции МХ (рмоль • мг ⁻¹ белка микросом мин ⁻¹)
Омуль	27,3 ± 6,9	5,5±0,2	127±0,31
Хариус	22,1 ± 5,6	5,4±0,1	129±4,61
Бычок желтокрылка	11,0 ± 1,1	1,3±	60±0,61
Чайка-бургомистр	32,1± 5,6	22,1± 5,6	240±1,71
Крыса	41,0 ± 7,1	51± 4,1	323±3,71

Уровень монооксигеназных активностей и их способность к индукции может определять уровень накопления и характер метаболизма ряда мутагенных и канцерогенных ксенобиотиков в тканях животных.

Ряд изоформ цитохрома Р-450 являются высоко индукцибельными: например, концентрация цитохрома Р-4501А1 может увеличиваться более чем в десятки раз под действием 2,3,7,8,-тетрахлородибензо-р-диоксина, 3-метилхолантрена или других полициклических ароматических углеводородов.

Важным свойством цитохромов Р450 является их способность к саморегуляции. Когда один из изоферментов Р450 активирован вследствие контакта с определенным субстратом, его содержание увеличивается. При этом другие формы Р450 разрушаются активными формами кислорода, которые не были использованы в оксигеназных реакциях.

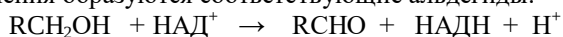
Система цитохромов Р450 участвует в метаболизме холестерина с образованием желчных кислот и стероидных гормонов, в активации витамина D и в перекисном окислении липидов. Продукты перекисного окисления липидов, пероксиды ДНК обезвреживаются с участием глутатионтрансферазы.

А.И.Арчаков и ряд других авторов полагают, что возникновение системы цитохромов Р450 в ходе эволюции было обусловлено появлением у растений токсичных вторичных метаболитов защищающих растения от поедания животными. Однако такое предположение не может объяснить того факта, что и растительные объекты обладают системой модификации ксенобиотиков, аналогичной животным.

Помимо цитохрома Р-450 в первой фазе детоксикации ксенобиотиков могут участвовать и некоторые другие ферменты. К ним относятся *флавиносодержащие монооксигеназы*, которые также находятся в мембранах эндоплазматического ретикулума. В отличие от изоформ цитохрома Р-450, ФМО встречается в тканях в форме одного, свойственного виду, энзима, и не индуцируется ксенобиотиками. Флавиносодержащие монооксигеназы, получают восстановительные эквиваленты от НАДФН, и окисляют, главным образом азотсодержащие вещества основного характера (гидразины, ариламины) и тиокарбамильные соединения (тиоацетамид и т.д.). Многие из субстратов флавиносодержащие монооксигеназы одновременно являются субстратами и изоформ цитохрома Р-450.

Спирты и альдегиды метаболизируются при участии алкоголь- и альдегиддегидрогеназ. Печень является основным органом метаболизма спиртов, кроме этого алкоголь- и альдегиддегидрогеназы присутствуют в почках и легких.

НАД-зависимая алкогольдегидрогеназа печени обладает невысокой субстратной специфичностью. Под влиянием этого энзима метаболизируют не только первичные и вторичные алифатические спирты, но и ароматические спирты, а также такие соединения, как, например, р-нитробензиловый спирт. В результате окисления образуются соответствующие альдегиды:



Альcoholдегидрогеназы существуют во множественных формах и обладают перекрестной субстратной специфичностью. Их активность индуцируется этанолом и угнетается альдегидами. Присутствие и характер индукции алкогольдегидрогеназ видоспецифичен и уровень их активности различен даже для отдельных рас и популяций людей, что определяют характер их алкогольной зависимости, развитие алкоголизма.

В метаболизме некоторых ксенобиотиков участвуют *флавопротеинредуктазы*. При взаимодействии флавопротеинредуктаз, например, с хинонами происходит генерация активных форм кислорода, и развитие свободнорадикальных реакций в клетках, которые модифицируют не только мембранные липиды, но и могут окислять ксенобиотики.

Активируемое таким образом превращение субстратов, дающее начало образованию активных форм кислорода, обозначается как "окислительно-восстановительный цикл". Помимо хинона по такому механизму метаболизируются, например, некоторые нитроароматические соединения. К числу токсикантов, активирующих свободнорадикальные процессы в клетке в процессе метаболизма при участии флавопротеинредуктаз, относятся в частности пестицид паракват, противоопухолевое средство адриамицин, антибиотик нитрофурантион, комплексные соединения железа и меди.

Несмотря на обилие ферментов, участвующих в метаболизме ксенобиотиков, основная часть токсикантов все-таки метаболизируется в системе цитохрома Р-450, претерпевая монооксигеназное окисление.

6. Экология фотосинтеза и пигменты растений

6.1. Экология фотосинтеза

Фотосинтез является энергетической основой жизни на Земле и ключевым звеном сложной системы метаболизма, обеспечивающего рост и развитие высших растений и водорослей. В экосистемах крупных пресных водоемов и морей основой трофических цепей являются фитопланктонные одноклеточные организмы. Принято считать, что суша и океан дают примерно равную продукцию фотосинтеза. Биомасса в пересчете на углерод растительности суши до воздействия человека была $1150 \cdot 10^9 \text{ т}$ и в настоящее время составляет $900 \cdot 10^9 \text{ т}$, а биомасса фотосинтетиков в океане $1,7 \cdot 10^9 \text{ т}$. Синтез и разрушение органических веществ в океане существенно отличаются от этих процессов на суше. Масса фитопланктона почти на три порядка меньше массы наземных растений. Это обусловлено значительно более быстрыми жизненными циклами главных фотосинтетиков океана – фитопланктонных организмов – по сравнению с наземными растениями. Полная замена массы растительности суши происходит в среднем за 15 лет, а обновление всей биомассы океана за 1 месяц. Органическое вещество, синтезированное фитопланктоном, практически полностью захватывается и разлагается в последующих трофических циклах. В осадок выпадает не более 0,1% синтезированной органики. Таким образом, скорость обращения метаболитов фитопланктонного сообщества многократно превосходит этот показатель у наземных фитоценозов.

Высокая скорость обращения органических соединений фитопланктонного сообщества предполагает возможность большой вариативности скоростей первичной продукции в зависимости от условий среды. Разные условия инсоляции, температуры, минерального питания и других факторов среды приводят к изменениям первичной продукции, числа клеток фитопланктонного сообщества, его видовой состав и состояния популяций каждого вида в сообществе. Эти процессы сопровождаются изменениями состояния фотосинтетического аппарата, как индивидуальных видов водорослей, так и всего фитопланктонного сообщества в целом.

6.2. Фотосинтез в водных экосистемах.

Использование поступающей солнечной энергии на суше и в океане значительно различаются. Распределение биомассы фитопланктона сильно зависит от содержания биогенных элементов, которое в свою очередь обусловлено характером циркуляции вод. Циклоническая циркуляция способствует подъему глубинных вод, обогащенных биогенными элементами, в верхние слои океана и обеспечивает высокую

биогеохимическую деятельность фитопланктона. Антициклонический режим приводит к слабому перемешиванию водных масс, что приводит к значительному дефициту биогенных элементов в верхнем слое воды и низкой биогеохимической активности фитопланктона, а, следовательно, и всех других организмов. Такая ситуация складывается в обширных акваториях центральных частей океанов.

Прибрежные зоны шельфа, где за счет активного перемешивания толщи вод происходит непрерывное пополнение убыли биогенных элементов в верхнем слое, как правило, складываются благоприятные условия для развития фитопланктона. Особенно интенсивно продукционные процессы протекают во фронтальных (градиентных) зонах. В открытых (пелагических) акваториях океана встречаются зоны апвеллинга (подъема глубинных вод), богатых биогенными элементами. Такие зоны чаще встречаются в субарктических и субантарктических водах, чем в зоне экватора. Фотосинтетическая продукция в открытом океане в год - 100, в прибрежной и шельфовой зонах - 300, а в зонах апвеллингов - 2200 т/км² (В.В.Добровольский).

Воды Мирового океана делятся по продуктивности (трофности) на олиготрофные (малопродуктивные), мезотрофные (промежуточные) и эвтрофные (высокопродуктивные). Такому делению вод океана соответствует содержание в воде соединений азота – главного биогенного вещества, как правило, лимитирующего продукционный процесс. На рис. представлены типичные распределения по глубине содержания нитратов в различных по продуктивности зонах Мирового океана. Такой характер распределения биогенных элементов обусловлен двумя противоположными процессами. Поступлением биогенов с больших глубин и быстрой их утилизацией фитопланктоном в верхних слоях воды.

В соответствие с продуктивностью водоема изменяется распределение фитопланктона в толще воды (Рис. 17). В высокопродуктивных водах, обеспеченных биогенными элементами, наибольшее количество фитопланктона находится в верхних приповерхностных слоях воды. В олиготрофных водах фитопланктон сосредоточен в основном на глубинах, до которых доходит света, достаточный для фотосинтеза, и в то же время имеются биогенные элементы. В таких условиях верхние слои воды, имеющие очень низкое содержание биогенов, мало заселены фитопланктоном. В связи с дефицитом минерального питания фотосинтетический аппарат этот фитопланктон при высокой инсоляции претерпевает фотоингибирование, а в крайних случаях может быть подвержен фотодеструкции. Мезотрофные воды по распределению фитопланктона по глубине занимают промежуточное положение между олиготрофными и эвтрофными водами.

Фотоактивный слой (слой воды, в котором процессы фотосинтеза превосходят процессы дыхания) олиготрофных зон океана может достигать 200 метровой глубины, тогда как для мезотрофных и тем более эвтрофицированных вод он ограничен десятками метров.

Подводная облученность определяется падающим на поверхность воды солнечным излучением, которое ослабляется поглощением воды, растворенными в ней веществами, взвешенными частицами, молекулярным рассеянием и рассеянием света на частицах. Наиболее значимыми факторами, влияющими на ослабление интенсивности и спектрального состава света под водой, являются растворенное органическое вещество и взвешенное в воде вещество, включающее частицы фитопланктона. На рис. 18 представлены типичные спектры подводной облученности различных зон океана. Как видно из этих спектров, максимум подводной облученности олиготрофных вод соответствует синей области спектра около 480 нм, тогда как для эвтрофных вод и достигает 560 нм (зеленая область спектра). В связи с этим цвет моря может значительно различаться. Он может быть насыщенно синим в тропических зонах океанов, сине-зеленым и зеленым в внутренних морях и белесовато-зеленым в прибрежных водах высоких широт.

Прозрачность водной среды определяется, как $E = e^{-\epsilon}$, где ϵ – показатель ослабления излучения. Показатель ослабления оптического излучения представляет собой сумму показателей поглощения и рассеяния. Простейший способ оценки прозрачности морской воды был предложен в 1865 году Секки и Чиаальди. Этот способ заключается в том, что производится измерение глубины, на которой удастся видеть белый диск диаметром 30 см. Таким образом, может быть определена относительная прозрачность воды. Наиболее прозрачные воды в океане позволяют увидеть диск Секки на глубине около 60 м.

Процессы фотосинтеза, прежде всего, зависят от интенсивности света на объекте. Зависимость скорости процесса фотосинтеза от интенсивности падающего света, называемая световой кривой фотосинтеза, имеет три стадии. При низкой облученности зависимость характеризуется прямой пропорциональностью скорости фотосинтеза от интенсивности света. Увеличение интенсивности света приводит к насыщению скорости фотосинтеза и ее выходу на постоянный уровень. Дальнейший рост интенсивности света может приводить к угнетению скорости фотосинтеза (рис.19). Часто такое явление называют «полуденным угнетением фотосинтеза». В крайних случаях интенсивная инсоляция приводит к необратимому повреждению фотосинтетического аппарата и к фотодеструкции фотосинтетических пигментов растительных организмов.

Традиционно принято определять первичную продукцию и видовой состав фитопланктона, а также его обилие по содержанию ХЛ *a* в определенном объеме воды. ХЛ *a* содержится во всех видах водорослей и цианобактерий в силу того, он является конечным переносчиком энергии в системе пигментов фотосинтетического аппарата. Кроме того, ХЛ *a* включен в белок-пигментные комплексы обеих фотосистем. Наиболее часто содержание ХЛ *a* определяют по спектрам поглощения ацетоновых или спиртовых экстрактов из клеток водорослей, предварительно осажденных на стекловолоконные фильтры при

пропускании через них нескольких литров природной воды. Наиболее точное и полное определение состава и количества пигментов в экстракте из водорослей достигается при использовании методов HPLC-хроматографии (жидкость-жидкостной хроматографии высокого разрешения).

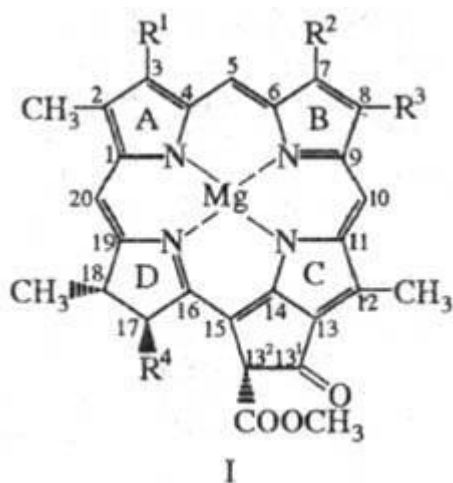
Определение первичной продукции, как правило, производится при помощи радиоактивного метода по включения в клетки водорослей радиоактивного углерода (О.О.Коблиц-Мишке). Этот метод трудоемок и требует больших затрат времени. Он имеет ряд принципиальных недостатков и множество источников методических ошибок. Тем не менее, именно этот метод наиболее широко используется для определения первичной продукции в водных экосистемах.

Традиционное определение видового состава, за последние десятилетия практически не претерпело каких-либо существенных изменений. Оно предполагает сгущение пробы природной воды путем фильтрации или осаждения, фиксацию полученного образца, определение видов водорослей в пробе и подсчет численности клеток каждого вида. Определение видового состава фитопланктона не поддается автоматизации. Это исследование весьма трудоемко и требует высокой квалификации от сотрудников, выполняющих данное определение.

6.3. Состав и организация фотосинтетических пигментов

Фотосинтетические пигменты способны поглощать солнечный свет с высокой эффективностью. Высокие значения мольной экстинкции фотосинтетических пигментов определяются системой сопряженных связей. В клетках эволюционно более древних фотосинтезирующих организмов (бактерии, водоросли) присутствуют разнообразные соединения (хлорофиллы, бактериохлорофиллы, бактериородопсин, каротиноиды, фикобилины), способные в определенном сочетании обеспечить поглощение большей части солнечного излучения. Набор и соотношение пигментов специфичны для различных групп и во многом зависят от условий обитания организмов. Пигменты фотосинтеза у высших растений значительно менее разнообразны. Основными пигментами, осуществляющими поглощение квантов света в процессе фотосинтеза, являются хлорофиллы, пигменты Mg-порфириновой природы.

Хлорофиллы содержат циклопентановое кольцо, конденсированное с порфириновым макроциклом, центральный атом Mg (рис. 20). Различия между хлорофиллами определяется заместителями $R^1 - R^4$. В пиррольном кольце D молекул хлорофиллов к остатку пропионовой кислоты обычно присоединены остатки высокомолекулярных изопреноидных спиртов, которые придают хлорофиллам способность встраиваться в липидные слои мембран хлоропластов.



Хлорофилл а: $R^1 = \text{CH} - \text{CH}_2$, $R^2 = \text{CH}_3$, $R^3 = \text{C}_2\text{H}_5$, $R^4 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{Y}$

Хлорофилл b: $R^1 = \text{CH} = \text{CH}_2$, $R^2 = \text{CHO}$, $R^3 = \text{C}_2\text{H}_5$, $R^4 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{Y}$

Хлорофилл d: $R^1 = \text{CHO}$, $R^2 = \text{CH}_3$, $R^3 = \text{C}_2\text{H}_5$, $R^4 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{Y}$,

где Y остаток фитола.

Основным путем биосинтеза хлорофиллов является конденсация двух молекул аминолевулиновой кислоты с образованием протопорфирина. Из последнего образуется непосредственный предшественник хлорофилла - хлорофиллид, содержащий атом Mg. Путем последующих реакций восстановления и присоединения остатков спиртов из него образуется хлорофилл.

Спектр поглощения различных форм хлорофиллов охватывает ближнюю ультрафиолетовую, видимую и ближнюю инфракрасную области спектра (у высших растений от 350 до 700 нм, а у бактерий — от 350 до 900 нм). ХЛ а является основным пигментом и характерен для всех организмов, осуществляющих окисленный, т. е. с выделением кислорода, фотосинтез. У зеленых и эвгленовых водорослей, мхов и сосудистых растений, кроме ХЛ а, имеется ХЛ b, содержание которого составляет 1/4-1/5 от содержания ХЛ

a. ХЛ *b* дополняет с обеих сторон участки спектра поглощения света между двумя максимумами поглощения ХЛ *a*. У некоторых групп водорослей, в основном бурых и диатомовых, дополнительными пигментами служат ХЛ c_1 , c_2 , c_3 и d . У пурпурных бактерий содержится бактериохл *a* и *b*, а у зеленых серных бактерий наряду с бактериохлорофиллом *a* содержатся бактериохлорофиллы *c* и *d*. В поглощении световой энергии участвуют также каротиноиды (пигменты полиизопреноидной природы). Цианобактерии и красных водорослей имеют фикобилины (пигменты с открытой тетрапиррольной структурой). У галобактерий в плазматических мембранах обнаружен единственный пигмент — сложный белок бактериородопсин, близкий по химическому строению родопсину — зрительному пигменту сетчатки глаза.

В органических растворителях как ХЛ, так и каротиноиды обладают интенсивными, узкими и достаточно далеко отстоящими друг от друга полосами поглощения света. ХЛ эффективно поглощают синий, красный и очень слабо - зеленый свет. В составе фотосинтезирующих мембран спектры пигментов существенно уширяются и в значительно большей степени перекрываются. Это связано с тем, что в отличие от растворов в хлоропластных мембранах пигменты ассоциированы с белками, липидами и взаимодействуют друг с другом.

На **рис. 21** представлены спектры поглощения главных групп пигментов, ассоциированных в фотосинтетический аппарат. Состав и соотношение пигментов зависят от вида растительного организма, спектрального состава и интенсивности его облучения, обеспечивая оптимальные условия усвоения световой энергии.

Фотосинтетические пигменты организованы в светособирающие белок-пигментных комплексы (ССК). В составе ССК содержат несколько сотен молекул пигментов. Эти комплексы обеспечивают поглощение и передачу световой энергии на реакционные центры (РЦ). Взаимодействуя с белками, фотосинтетические пигменты и, в том числе, ХЛ изменяют свои оптические свойства. В «антенном» комплексе существуют разные формы ХЛ, спектральные свойства которых значительно отличаются от растворов ХЛ. Существование разных форм пигментов, перекрывающих спектры поглощения друг друга, обеспечивают эффективную миграцию энергии поглощенных квантов света к РЦ. Расстояние, на которое осуществляется перенос энергии возбуждения молекул внутри ССК, составляет около 1 нм. Передача энергии возбуждения сопровождается некоторыми потерями, которые могут составлять до 10 % при передаче от ХЛ *b* к ХЛ *a* и до 60 % от каротиноидов к ХЛ. Организация пигментов в ССК обеспечивает за время порядка 10^{-10} с перенос возбуждения молекул от коротковолновых пигментов к наиболее длинноволновым формам ХЛ *a*, находящегося в РЦ.

Размеры антенного комплекса и его пигментный состав зависят от интенсивности и спектра облучения в ходе выращивания растительного объекта. Длительная адаптация к условиям интенсивного освещения ведет к уменьшению количества пигментов в антенном комплексе. Низкая интенсивность освещения вызывает дополнительный синтез пигментов и приводит к увеличению их количества в составе (ССК). Значительные изменения состава фотосинтетических пигментов могут происходить, достаточно медленно, так как процессы синтеза и деградации пигментов, как правило, занимают более суток.

ССК растений находятся в мембранах тилакоидов. У цианобактерий основная часть ССК вынесена за пределы мембран в прикрепленные к ним фикобилисомы — палочковидные белок-пигментные комплексы, в которых находятся различные фикобилины: на периферии фикоэритрины (с максимумом поглощения при 495—565 нм), за ними фикоцианины (550—615 нм) и аллофикоцианины (610—670 нм), последовательно передающие энергию на ХЛ *a* (680—700 нм) РЦ. Соотношение фикобелиновых пигментов может широко варьировать в зависимости от вида и условий среды.

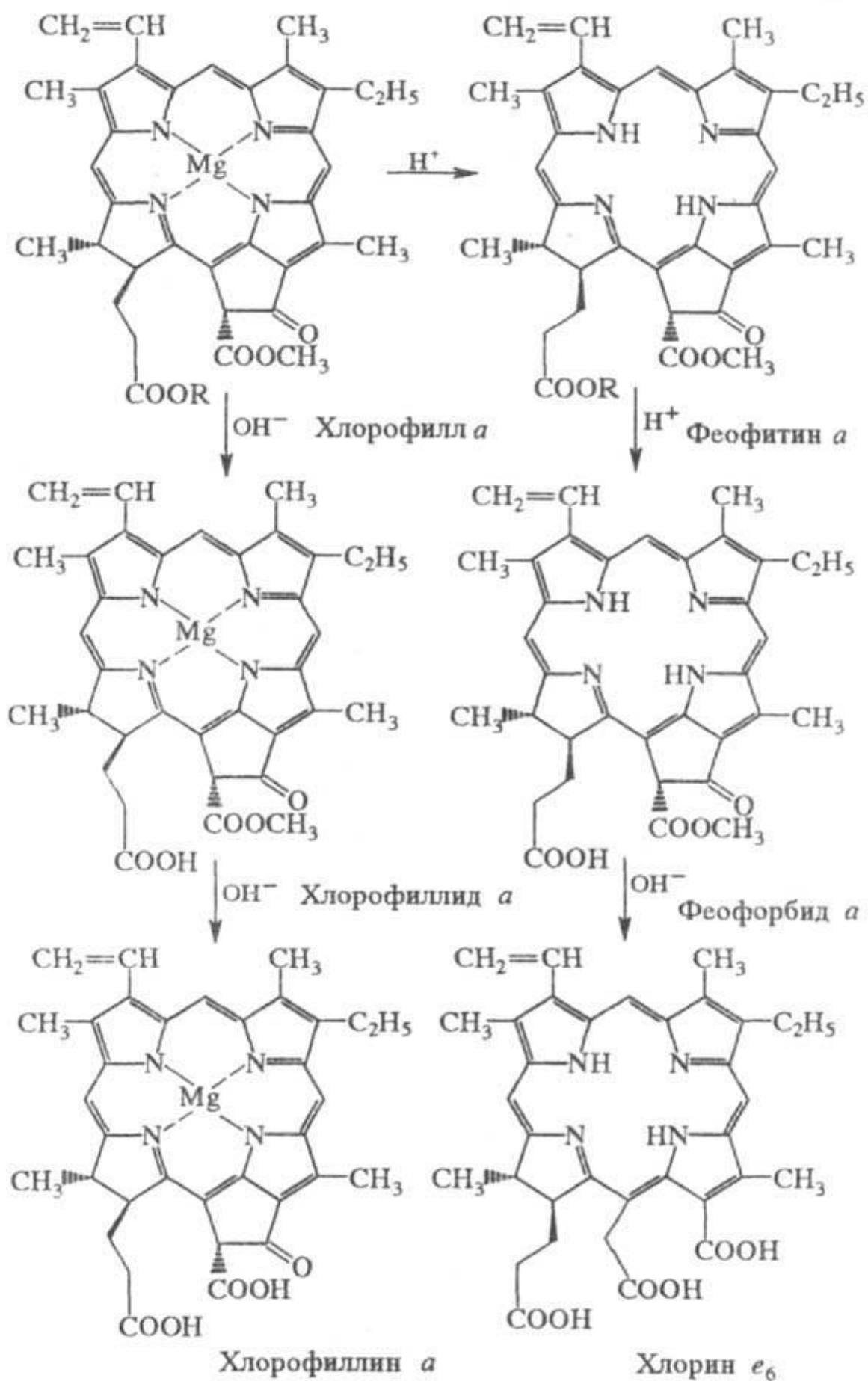
Каротиноиды являются не только светосборщиками в составе антенных комплексов ФСА, но и выполняют важнейшие защитные функции. С одной стороны каротиноиды обеспечивают защиту от фотосенсибилизированного окисления за счет тушения триплетных состояний ХЛ и синглетного кислорода. С другой стороны каротиноиды способны регулировать процессы тепловой диссипации возбужденных состояний ХЛ в условиях избыточного для данного организма освещения. Все мутанты, лишенные синтеза каротиноидов, погибают при освещении, которое является нормальным для исходных форм растительных организмов. Агенты, препятствующие биосинтезу каротиноидов, обладают гербицидным действием на растения.

6.4. Фототодеструкция фотосинтетических пигментов

Деградация фотосинтетических пигментов растений, наблюдаемая при их естественном старении и многих стрессовых состояниях, носит преимущественно фотоокислительный характер. Несмотря на давний интерес к этому явлению, имеющему глобальные масштабы, сравнительно мало известно о механизмах и путях деградации фотосинтетических пигментов растений.

Под действием кислот и оснований хлорофиллы легко подвергаются структурным изменениям, основные из которых приведены на схеме **2**. Обработка слабыми растворами кислот приводит к удалению центрального иона Mg с образованием феофитинов. Концентрированная соляная кислота наряду с Mg отщепляет фитол с образованием феофорбидов. Под действием на хлорофилл концентрированной щелочи приводит раскрытие циклопентанового кольца и образование хлоринов. При обработке слабыми щелочами хлорофиллы теряют сложноэфирные группы, сохраняя центральный ион магния. При этом образуются хлорофиллиды и хлорофиллины.

Схема 1



Клетки цианобактерий обладают высокой устойчивостью к действию больших доз видимого света и УФ-излучения. Во всех случаях фотодеградация пигментов начинается после полного ингибирования фотосинтетических реакций. Действие высоких интенсивностей видимого и УФ-излучений на цианобактерии вызывает неравномерное выцветание пигментов, которое ингибируется при низких температурах (1 °С). Квантовый выход деградации пигментов изменяется от стадии процесса. Максимальный квантовый выход выцветания пигментов *Anabaena. variabiliss* составляет:

	Фикобилины	Хлорофилл <i>a</i>	Каротиноиды
УФ-излучение	$2 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-2}$
Видимый свет	$2 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-3}$

УФ-излучение при высокой плотности мощности ($1,4 \text{ мМ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) вызывает быструю (в течение 10 минут) деградацию небольшой (менее 10%) части всех пигментов. Затем, вплоть до 90 минут от начала облучения, относительно медленно выцветают только фикобилины. Дальнейшие стадии фотодеградации (до 210 мин) приводят к выцветанию каротиноидов и хлорофилла до уровня ниже 10% от исходного, которое наблюдается только после полного истощения фикобилинов. При этом каротиноиды выцветают несколько быстрее хлорофилла. В отсутствие кислорода (при барбатировании облучаемой суспензии цианобактерий азотом) выцветанию подвергаются только фикобилины, тогда как содержание каротиноидов и хлорофилла *a* практически не изменяется. При низких температурах (1 и 8 °С) отношение скоростей выцветания каротиноидов к хлорофиллу выше, чем при 20 и 32 °С. Видимое излучение большой плотности мощности ($23,6 \text{ мМ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) вызывает выцветание каротиноидов и хлорофилла после лаг-фазы, достигающей 60 минут. При этом выцветание каротиноидов опережает выцветание хлорофилла. Фикобилины практически не подвергаются фотодеградации. Соотношение скоростей выцветания пигментов не зависит от температуры в диапазоне от 1 до 32 °С. Фотодеградация хлорофилла при действии УФ- и видимого излучения на ранних стадиях происходит преимущественно за счет длинноволновых форм этого пигмента. В ходе фотодеградации пигментов цианобактерий происходит образование продукта с максимумом в области 410-420 нм, что характерно для фотодеградации хлорофилла *a* в растворе.

Совокупность приведенных фактов позволяет заключить, что интенсивное освещение фотосинтезирующих объектов вызывает генерацию активных форм кислорода и приводит к блокированию реакционных центров, а в последствии к. деструкции каротиноидов и хлорофилла. Видимо, деградация фикобилинов происходит за счет их прямого взаимодействия с УФ-излучением и не имеет прямой связи с процессами активации кислорода.

6.4. Фотозащитные пигменты растительных организмов.

Функционирование растительных организмов теснейшим образом связано с поглощением и утилизацией ими энергии солнечного излучения в ходе фотосинтеза. Основные пигменты растений, локализованные в тилакоидных мембранах хлоропластов, эффективно улавливают свет и обеспечивают работу ФСА. Однако далеко не всегда свет, поглощаемый ФСА, может быть в нем усвоен (рис. 19).

При насыщении фотосинтеза существенная часть поглощенной радиации не утилизируется ФСА и может вызывать его фотоингибирование и даже фотодеструкцию. Избыток света для процессов фотосинтеза возникает не только при действии высоких потоков солнечной радиации, но и при экстремальных температурах, засухе, дефиците элементов минерального питания и действии ряда других факторов. Создание или разборка ФСА делает его более уязвимым для фотоповреждения на ювенильной стадии развития растений, как и при их старении. В условиях, когда ФСА растения не способен усвоить поглощенный поток световой энергии, происходят повышение уровня АФК и фотоокислительное повреждение вплоть до гибели растений. Кроме того, наряду с Хл в клетке содержится целый ряд соединений, таких как порфирины, Fe-S-белки митохондрий, флавины и птерины, способных под действием облучения в видимой части спектра приводить к образованию АФК.

Наряду с избыточным излучением в видимой части спектра (фотосинтетически активной радиации, ФАР), повреждение растений может вызывать УФ излучение, доля которого в солнечном излучении на поверхности Земли достигает 7–9%. Кванты УФ-В излучения могут оказывать прямое повреждающее действие на клетки растений, в частности, повреждать белок D1 ФСА. Деструктивные эффекты более длинноволнового УФ-А излучения, как правило, опосредованы АФК. Для защиты от повреждения солнечной радиацией растения используют ряд регуляторных и фотозащитных механизмов. По-видимому, первые фототрофные организмы подвергались действию более жесткого и интенсивного УФ излучения, чем современные. За счет этого механизмы репарации УФ-индуцированного повреждения нуклеиновых кислот и важных белков ФСА возникли в процессе эволюции одними из первых.

К соединениям, участвующим в защите от повреждения УФ, относят микоспорин-подобные аминокислоты, фенольные кислоты, флавоноиды и некоторые другие вещества. Некоторые флавонолы и

антоцианы играют важную роль в защите высших растений от повреждения видимым светом. Такую же функцию, видимо, могут выполнять беталаины и некоторые Кар.

У многих видов низших растений, в том числе почти у всех групп морских красных и зеленых водорослей, а также динофлагеллят, обнаружены микоспорин-подобные аминокислоты, сходные с микоспоринами — водорастворимыми веществами, первоначально найденными у грибов. Хромофором у микоспорин-подобных аминокислот

является циклогексеновая или циклогексениминовая группа, которая образуется на ранних стадиях шикиматного пути. Величины молярных коэффициентов поглощения микоспорин-подобных аминокислот находятся в пределах 24–50 л/(ммоль · см). Микоспорин-подобные аминокислоты не обладают заметной флуоресценцией и не образуют свободно-радикальных продуктов при облучении в различных спектральных диапазонах, а низкий квантовый выход образования триплетных состояний микоспорин-подобных аминокислоты делает маловероятным наличие у них фотодинамического эффекта. Напротив, имеются сообщения о том, что микоспорин-подобные аминокислоты являются эффективными тушителями синглетного кислорода.

Рис. 21. Некоторые распространенные микоспорин-подобные аминокислоты и максимумы их поглощения в спиртовых экстрактах [12]

Микоспорилглицин в основном состоянии эффективно подавляет фотоповреждение бактерий за счет тушения синглетного кислорода, образованного фотосенсибилизаторами. Эти свойства, наряду с высокой фотостабильностью *in vitro* и *in vivo*, обеспечивают эффективность микоспорин-подобных аминокислот в качестве соединений, защищающих от повреждения УФ-излучения путем экранирования.

Фенольные соединения

Число ныне известных природных фенольных соединений превышает 100 000; у растений эта группа соединений характеризуется необычайным разнообразием химической структуры и широким распространением. Фенольные соединения обнаружены у всех видов растительных организмов. Характерным признаком фенольных соединений является наличие в составе молекулы одного или нескольких ароматических ядер с гидроксильными группами в качестве заместителей. Многие фенольные соединения синтезируются в хлоропластах и цитоплазме и после гликозилирования транспортируются в вакуоли, в которых они и накапливаются. Содержащиеся в растениях фенольные соединения классифицируют по биогенетическому принципу и различают по структуре углеродного скелета. На **рис. 22** представлен ряд фотозащитных пигментов фенольной природы.

Рис. 22. Типичные представители фотозащитных пигментов фенольной природы

Пути биосинтеза фенольных соединений интегрированы в общий метаболизм клетки, тесно связаны с обменом аминокислот, углеводов и находятся под контролем различных факторов, таких как интенсивность и спектральный состав освещения, доступность элементов минерального питания и водный режим. Чрезвычайно широкое распространение фенольных соединений свидетельствует о большом значении этих веществ в жизнедеятельности растений. Давно известно, что антоцианы и другие флавоноиды придают листьям, цветкам, плодам и семенам яркую окраску, привлекающую опылителей и распространителей семян. Флавоноиды играют ключевую роль в передаче сигналов между растениями и микроорганизмами, а также в защите от фитопатогенных микроорганизмов.

Флавоноиды являются биологически и фармакологически активными веществами, эффективными при профилактике и лечении множества заболеваний, что связывают с наличием у них свойств антиоксидантов. Кроме того, флавоноиды являются хелаторами ионов металлов переменной валентности (в частности, железа), перехватчиками пероксильных органических радикалов и тушителями синглетного кислорода. Спектральные свойства некоторых фенольных соединений представлены на **рис. 23**.

Рис. 23. Спектры поглощения некоторых флавоноидов и фенольных кислот (препараты фирмы «Serva» в метаноле)

Постулируется, что синтезируемые в результате фенольные кислоты и их производные могут вносить определенный вклад в снижение уровня АФК в клетке. Тем не менее, строгих доказательств приоритетного значения антиоксидантных свойств фенольных соединений для выполнения их фотозащитной функции *in vivo* пока не получено. У растений фенольные соединения выполняют различные защитные функции, до недавнего времени основной их функцией считалась защиты от фитопатогенов и травоядных животных.

Типичный спектр поглощения фенольных соединений в УФ области характеризуется двумя полосами (**рис. 23**). Полоса с максимумом около 280 нм, обусловленная наличием в молекулах ароматических ядер, присутствует у всех фенольных соединений. У большинства соединений этой группы длинноволновая полоса лежит в диапазоне 300–360 нм, ее положение отличается у разных классов фенольных соединений. У антоцианов и их агликонов антоцианидинов длинноволновый максимум поглощения располагается в сине-зеленой части видимого спектра. Максимум поглощения цианидина, доминирующего агликаона антоциана листьев и плодов, придающего им красную окраску, расположен около 525 нм. Значения коэффициентов поглощения фенольных соединений составляют 10–35 л/(ммоль · см). Антоцианы могут образовывать комплексы с флавонолами и флавонами в результате возникновения водородных связей между гидроксильными группами ангидрооснования антоцианидинов и гидроксильными группами в ароматическом ядре (копигментация). В результате такого взаимодействия достигается

огромное разнообразие окраски цветков растений. Копигментация может приводить к увеличению коэффициентов поглощения, bathochromным сдвигам максимумов и уплощению спектр. Такие эффекты оказывают влияние на эффективность поглощения излучения этими соединениями в клетках и тканях растений. В случае распространенных у высших растений флавонолов (гликозидов кверцетина и кемпферола) еще более значительные bathochromные сдвиги длинноволновой полосы поглощения (вплоть до сине-фиолетовой области спектра) происходят *in vivo* вследствие таутомеризации.

**Таутомерия - явление обратимой изомерии, при которой два или более изомера легко переходят друг в друга. При этом устанавливается таутомерное равновесие, и вещество одновременно содержит молекулы всех изомеров в определенном соотношении.*

Меланины, в отличие от лигнинов и дубильных веществ, образуются в растениях в норме гораздо реже, и чаще возникают при различных повреждениях. Эти темноокрашенные пигменты являются наименее изученной группой гетерополимерных фенольных соединений. Обычно они образуются при ферментативном окислении тирозина или диоксифенилаланина.

Беталаины представляют собой отдельную группу водорастворимых азотсодержащих соединений, близких к алкалоидам, встречающихся у ограниченного числа видов покрытосеменных растений (у девяти семейств видов порядка Caryophyllales). Выделяют два типа беталаинов: бетацианины (рис. 24а) с окраской, варьирующей от темно-фиолетовой до розовой, и преимущественно желтые бетаксантины (рис. 24б).

Рис. 24. Беталаины. Типичные представители бетацианинов (а) и бетаксантинов (б)

Спектры поглощения бетацианинов характеризуются широкой полосой с максимумом около 539–543 нм, в результате внутримолекулярной копигментации возможен bathochromный сдвиг максимума поглощения к 550 нм. На спектрах поглощения бетаксантинов присутствуют три основные полосы с максимумами при 217, 262, 456–471 нм. Беталаины обладают выраженной антирадикальной активностью, более высокой при pH>6. Предполагается, что у видов со слабой способностью к синтезу антоцианов, но накапливающих значительные количества беталаинов, последние выполняют функции антоцианов.

Каротиноиды являются вспомогательными фотосинтетическими пигментами, присутствуют у всех фотоавтотрофных организмов, где также выполняют защитную функцию. В настоящее время известно более 800 видов Кар, которые могут иметь линейную либо циклическую форму. У высших растений Кар могут синтезироваться в темноте. Их содержание и состав определяется вкладом синего и УФ излучения в спектр света, к которому адаптировано растение. По наличию заместителей Кар подразделяются на две группы: простые углеводородные соединения — каротины и их окисленные производные — ксантофиллы, содержащие окси-, эпокси- и кетогруппы.

В растворах форма и интенсивность полос на спектрах поглощения Кар определяется числом конъюгированных двойных связей в составе углеродного скелета, числом и характером заместителей, конфигурацией молекулы, а также природой и полярностью растворителя. Значения коэффициента поглощения Кар в максимуме, расположенном в сине-зеленой области (рис. 25), достигают 180 л/(ммоль · см).

У высших растений преобладают β-каротин, а также ксантофиллы, такие как лютеин, неоксантин, виолаксантин, антраксантин и зеаксантин. У одноклеточных водорослей разнообразие ксантофиллов существенно выше. Некоторые виды водорослей накапливают так называемые вторичные (не участвующие в фотосинтезе) Кар, например, β-каротин и некоторые кетокаротиноиды.

Высшие растения также способны накапливать вне тилакоидов эфиры ксантофиллов и жирных кислот, состав которых варьирует в зависимости от вида. Каротиноиды являются эффективными перехватчиками свободных радикалов, в том числе свободно-радикальных АФК. Благодаря большому числу конъюгированных двойных связей, молекулы Кар способны с высокой эффективностью тушить возбужденные состояния Хл, в том числе триплетные, а также синглетный кислород.

Рис. 25. Спектры поглощения основных каротиноидов, выделенных из листьев высших растений (спектры измерены в ацетоне).

Римскими цифрами указаны номера максимумов поглощения по.

Некоторые Кар участвуют в циклических превращениях (т.н. ксантофильных циклах), в ходе которых образуются формы, обеспечивающие диссипацию избыточной энергии возбуждения Хл в виде тепла. Это один из основных путей защиты ФСА от фотоповреждения. Известны три типа ксантофилловых циклов. Виолаксантиновый и лютеин-5,6-эпоксидный характерны для большинства высших и некоторых низших растений. Диадноксантиновый цикл типичен для диатомовых динофициевых водорослей.

В последнее время также активно рассматривается механизм реализации фотозащитной функции Кар, основанный на экранировании избыточного излучения. В подобных механизмах, описанных у целого ряда водорослей и высших растений, участвуют устойчивые к фотодеструкции формы Кар с экстрапластидной и экстратилакоидной локализацией.

Другие фотозащитные соединения. Большинство известных экранирующих пигментов относится к одной из четырех перечисленных выше групп. Также известен ряд менее распространенных фотозащитных соединений, точная химическая структура которых еще не установлена. Так, разнообразие УФ-защитных соединений микроводорослей до сих пор изучено далеко не полно, постоянно поступают сообщения об открытии новых соединений. Так, антарктическая микроводоросль *Phaeocystis pouchetii* при повышении УФ-облученности накапливает соединение с максимумами поглощения при 323, 271 и 211 нм, которое не

относится ни к одному из ныне известных классов пигментов. Нельзя не отметить т.н. лишайниковые кислоты, накапливаемые практически всеми видами лишайников для защиты клеток фотобионта от фотоповреждения в крайне неблагоприятных условиях, которыми характеризуется их среда обитания. Интересно, что цианолишайники в качестве экранирующего пигмента содержат преимущественно *сцитонемин*, характерный для свободноживущих и образующих маты цианобактерий. Явление развития бурой окраски, обнаруженное у некоторых цианобактерий, в особенности у цианобактериальных матов, в настоящее время приписывают накоплению именно этого пигмента.

Сцитонемин — одно из первых соединений, для которого было строго доказано участие в экранировании вредоносного УФ излучения. Это соединение содержится в чехлах многих видов наземных цианобактерий и отсутствует у большинства планктонных форм. Сцитонемин является продуктом поликонденсации триптофана и фенилпропаноидных молекул-предшественников. Максимум поглощения сцитонемина *in vivo* располагается около 400 нм. В природе сцитонемин встречается, главным образом, в окисленной форме зеленого цвета, но в условиях нижних слоев цианобактериальных матов он может восстанавливаться и приобретать красную окраску. Следует отметить, что высокие содержание сцитонемина обеспечивали эффективную защиту от УФ-индуцированного повреждения не только для делящихся, но и покоящихся обезвоженных клеток, т.е. в условиях, когда прочие фотозащитные механизмы не функционируют.

6.5. Оптические свойства растительных организмов.

Растительные клетки и ткани состоят из множества структур, различных по морфологии, химическому составу и физическим свойствам. Они содержат множество пигментов и с точки зрения оптики являются сложными системами. Эффективность поглощения света как фотосинтетическими, так и фотозащитными пигментами в значительной степени определяется не только их общим содержанием, но и рядом других факторов. В частности, у зеленых водоросли *Dunaliella tertiolecta* при адаптации к интенсивному освещению более половины изменений поглощения света Хл *a* объясняется изменением степени стекинга мембран тилакоидов. Адаптивные перестройки пигментного аппарата отражаются на оптических свойствах растений. Анализ спектров отражения и поглощения растительных объектов дает ценную информацию о состоянии ФСА и фотозащитных механизмах этих объектов.

Форма спектров поглощения пигментов *in vivo* существенно отличается от спектров пигментов, выделенных в раствор. По сравнению с растворами, спектры пигментов в составе клеток и тканей имеют уплощенные максимумы, смещенные в длинноволновую область. На форму и положение максимумов существенное влияние также оказывает полярность и окружающих пигменты молекул, организация структур, содержащих пигменты, и эффекты «упаковки». На спектральные свойства фотосинтетических пигментов (Хл и Кар) *in vivo* влияют белки, с которыми они связаны в составе комплексов, образующих ФСА. Спектры поглощения вакуолярных пигментов существенно изменяются в результате взаимодействия их молекул друг с другом и различными веществами, содержащимися в вакуолярном соке. На спектральные свойства пигментов *in vivo* значительное влияние оказывает светорассеяние. Оно обусловлено многократным внутренним отражением и преломлением, что приводит к увеличению оптического пути света в тканях растений. Так, одни и те же количества пигментов в тканях листа поглощают свет в 3-4 раза больше, чем экстракт пигментов того же листа.

УФ излучение, достигающее земной поверхности, обладает высокой цитотоксичностью. Большую опасность представляет УФ-В диапазон (от 280 до 320 нм). УФ-А излучение (от 400 до 320 нм), доля которого в солнечном спектре в десятки раз выше, чем УФ-В, также оказывает существенные воздействия на растения. Наибольшее ингибирование фотосинтеза при естественной инсоляции наблюдается именно при действии УФ-А излучения. В силу этих обстоятельств велико значение длинноволнового склона максимума поглощения флавонолов, расположенного в диапазоне 350–360 нм, а также ранее описанных внутри- и межмолекулярных взаимодействий фенольных соединений, изменяющих спектры этих соединений *in planta*. Особенности спектров поглощения антоцианов, максимумы которых находится в зеленой части видимой области спектра, предопределяют их участие в защите от фотоповреждения интенсивным видимым светом. Коротковолновый максимум поглощения антоцианов не имеет физиологического значения, так как находится в УФ-С диапазоне спектра (короче 280 нм). При невысоком содержании хлорофиллов антоцианы перехватывают значительную часть солнечной радиации в широком диапазоне от зеленой до желто-оранжевой части спектра, что существенно для защиты от фотоповреждения созревающих плодов и стареющих листьев. Это важно еще и потому, что максимум энергии в солнечном спектре приходится именно на зеленую область. Существенно, что некоторые ретро- и кетокаротиноиды, а также беталаины (бетацианины) по форме спектра и положению максимумов *in vivo* чрезвычайно сходны с Ант и также способны поглощать значительную часть ФАР в зеленой области спектра. По данным спектроскопии отражения, родоксантин способен перехватывать излучение в широкой полосе 450–600 нм, в которой солнечное излучение наиболее глубоко проникает в ткани листа.

В растворах спектры каротинов, ксантофиллов и их производных (например, эфиров ксантофиллов с жирными кислотами), участвующих в ослаблении излучения, достигающего Хл, близки к таковым Кар; они выполняют функции светосбора и непосредственно связаны с пигмент-белковыми комплексами ФСА. Известно, что Кар высших растений и одноклеточных водорослей *in vivo* могут перехватывать

значительную часть света, которая в их отсутствие могла бы поглощаться Хл *a* и особенно Хл *b*, а также конкурировать с «фотосинтетическими» Кар за поглощение света в синей области спектра. Кроме того, особенности спектров поглощения Кар позволяют предположить участие этих пигментов в защите от длинноволнового УФ при их высоком содержании. Однако значение Кар в этом плане, по-видимому, не столь велико по сравнению с фенольными соединениями.

При накоплении экранирующих пигментов в больших количествах происходит дополнительное уширение их полос поглощения. В результате они приобретают способность оказывать фотозащитное действие не только вблизи максимумов поглощения, но и в тех участках спектра, где их коэффициенты поглощения невелики. Этому также способствует увеличение длины оптического пути вследствие многократного внутреннего отражения и преломления света в растительной клетке. Фотозащитные пигменты способны обеспечивать поглощение излучения в очень широкой спектральной полосе. При накоплении этих соединений поглощение света растительными клетками и тканями повышается, однако ФСА при этом получает меньшую долю поглощенной энергии.

Для многих видов одноклеточных водорослей, характерны изменения окраски в ответ на действие сильного света или дефицита минерального питания. В большинстве случаев это происходит в результате снижения содержания Хл и накопления различных вторичных Кар. Индукция синтеза высоких количеств Кар, называемая также каротиногенезом, является характерным ответом одноклеточных водорослей, особенно представителей Chlorophyta, на действие интенсивного освещения, высокой солености, экстремальных температур. Принято считать, что каротиногенез, наряду с прочими ответами на неблагоприятные воздействия, является адаптивной реакцией, обеспечивающей выживание микроводорослей в экстремальных условиях среды обитания. Для исследования каротиногенеза в качестве объектов часто используют т.н. «снежные водоросли» (snow algae) (*Chlorella nivalis*, *Chloromonas rubroleosa*, *Parietochloris incisa* и ряд других), растущие на снежных склонах под ярким солнечным светом при температурах, близких к 0 °С. В таких условиях (особенно на ярком свете) окраска этих водорослей изменяется с зеленой на желто-оранжевую или красную за счет усиленного синтеза Кар. Среди пигментов, накапливаемых различными микроводорослями в неблагоприятных условиях наиболее часто встречаются β-каротин и астаксантин. Накопление этих Кар индуцируется в условиях повышенной скорости генерации АФК. Известно, что синтез β-каротина у этих водорослей можно вызывать искусственно даже при низких освещенностях, если обработать их клетки фотодинамическими красителями, генерирующими синглетный кислород, (метиленовым синим и бенгальским розовым). При добавлении к водорослям генераторов радикальных АФК подобных эффектов не наблюдалось. Добавление же в среду тушителей синглетного кислорода ингибирует каротиногенез.

Таким образом, генерация в клетках синглетного кислорода может приводить к индукции каротиногенеза у микроводорослей в неблагоприятных условиях. Роль свободнорадикальных АФК в этих процессах, по-видимому, менее важна. Были высказаны предположения, что АФК могут действовать как вторичные мессенджеры, однако точный механизм передачи редокс-сигнала с участием АФК пока не известен. С синтезом β-каротина у *Dunaliella* при адаптации к действию сильного света связана координированная амплификация, по крайней мере, трех генов, кодирующих ферменты биосинтеза β-каротина: фитоин-синтазу (*phy*), фитоин-десатуразу (*pds*), а также белок, стабилизирующий липидные глобулы (*cgp*, carotene-globule-associated protein) и белок из семейства ELIP (early light-induced proteins), предположительно участвующий в образовании комплексов с молекулами β-каротина.

Глобулы сходного состава, но меньшего размера и в меньшем количестве, обнаружены и у других видов рода *Dunaliella*, не накапливающих β-каротин. Сходные процессы протекают при индукции каротиногенеза у *H. pluvialis*. На рис. 26 представлен гипотетический механизм индукции каротиногенеза. На рис. 27 приведены скорректированные на рассеяние и нормированные на длинноволновый максимум Хл спектры поглощения, клеточных суспензий культур *P. incisa*, выращенных при освещенности от 35 до 400 мкЕ/(м²с).

Рис. 26. Гипотетический механизм индукции каротиногенеза у *Dunaliella* (по [165], с изменениями).

Обозначения: а) — стадия активации; б) — собственно, каротиногенез; X — гипотетический рецептор; Cbr — белок-гомолог ELIP, синтезируемый при каротиногенезе; Psy — фитоинсинтаза; Pds — фитоиндесатураза; Cgp — белок-стабилизатор липидных глобул.

Корректное измерение спектров поглощения суспензий требует проведения коррекции на рассеяние. Для компенсации рассеяния может быть использован метод, который состоит в том, что учет рассеяния производится путем сопоставления спектров поглощения одного и того же образца, расположенного на разных расстояниях от измерительной сферы. Та часть света, которая проходит через образец без рассеяния остается неизменной в обоих вариантах измерения, а рассеянный свет попадает в интегрирующую сферу в большем количестве при близком расположении образца к сфере. Если снимать спектры при стандартном расположении кюветы вблизи входного окна интегрирующей сферы ($A_1(\lambda)$) и на некотором расстоянии от неё (около 1 см) ($A_2(\lambda)$), что соответствует двум углам сбора рассеянного света (рис. 1). Спектр поглощения, компенсированный на рассеяние $A(\lambda)$ можно рассчитать по формуле:

$$A(\lambda) = A_2(\lambda) - [A_2(800)/(A_2(800) - A_1(800))] * [A_2(\lambda) - A_1(\lambda)],$$

где $A_1(800)$ и $A_2(800)$ — оптические плотности при 800 нм, в которой пигменты не обладают заметным поглощением. Данный метод предложен М.Н.Мерзляком и др. в 2000 году.

Рис. 27. Средние скорректированные на рассеяние спектры поглощения (1-3) суспензий клеток *P. incisa* с различным соотношением каротиноидов и хлорофиллов, выращенных на полной среде (а) и в отсутствие азота (б) и их дифференциальные спектры (в, г). Разностные спектры (рис. 27а и 27б, кривые 2–1, 3–1 и 2'–1', 3'–1') показывают, что увеличение поглощения света суспензиями водорослей, находящихся в неблагоприятных состояниях обусловлены ксантофиллами. Этот эффект был сильнее проявляется у водорослей, выращенных на дефицитной по азоту среде.

У большинства видов растений Кар представлены ксантофиллами и каротинами, обладающими характерным спектром поглощения с тремя максимумами в синей области спектра (400–480 нм) и типичной желто-оранжевой окраской. Состав «фотосинтетических» или первичных Кар растений достаточно консервативен, однако в неблагоприятных условиях у некоторых видов растений происходит накопление необычных Кар, например кетокаротиноида родоксантина. Из-за присутствия в молекуле пары конъюгированных кето-групп, максимум в спектре родоксантина существенно смещен в длинноволновую область по сравнению с обычными для ФСА ксантофиллами и находится в зеленой области спектра, что придает растворам этого пигмента, а также содержащим его органам растений красную окраску.

Листья алое (*A. arborescens*) в благоприятных условиях имеют зеленую окраску, а в неблагоприятных – краснеют. Покраснение листьев алое обусловлено накоплением родоксантина. Спектры отражения целых листьев и препаратов адаксиальной хлоренхимы *A. arborescens* обладают типичными для высших растений низкими коэффициентами отражения в синей области спектра и высокими в ИК-диапазоне, в красной области присутствует полоса (с R_{min} около 678 нм), обусловленная поглощением Хл. Спектры отражения листьев и адаксиальной хлоренхимы близки, за исключением более низкого (30–34%) отражения адаксиальной хлоренхимы в ИК-диапазоне (рис. 28). У листьев и адаксиальной хлоренхимы развитие красной окраски сопровождается снижением отражения в диапазоне 500–600 нм. У красных листьев наблюдаются низкие значения отражения при 550 нм. Хроматографическое определение Кар и Хл *A. arborescens* выявило в дополнение к существенной разнице в содержании родоксантина лишь небольшие различия в содержании других Кар и Хл. Таким образом, родоксантин накапливающийся в хлоропластах листьев алоэ, значительно ослабляет свет в зеленой области спектра и снижает риск фотоповреждения в неблагоприятных условиях. При этом родоксантин, видимо, не участвует в работе ферментативных фотозащитных механизмов, функционирующих в тилакоидах хлоропластов и не входит ни в один светособирающий комплекс.

Рис. 28. Спектры отражения (а) и поглощения (б) препаратов адаксиальной хлоренхимы *A. arborescens*. а) врезка: зависимость между $R(550)$ и $R(678)$ для препаратов зеленых (светлые символы) и красных (темные символы) листьев; линия — аппроксимация этой зависимости для целых листьев. б) внизу: спектр дисперсии (σ) значений доли поглощенного света (по правой шкале).

Рис. 29. Спектры поглощения и пигменты препаратов адаксиальной хлоренхимы зеленых и красных листьев *A. arborescens* (см. также рис. 3.6). На врезке Кар — каротины и ксантофиллы кроме родоксантина.

Высшие растения, подвергающиеся действию высоких потоков солнечного света и других неблагоприятных факторов, часто приобретают красную окраску. Обычно причиной изменения окраски в условиях стресса является накопление в вакуолях клеток эпидермы и лежащих под ней тканей антоцианов. В то же время красная окраска наблюдается и у видов, практически лишенных способности к синтезу антоцианов. Красный цвет листьев и побегов в этом случае обусловлен накоплением в пластидах тех же тканей кетокаротиноида родоксантина (у некоторых видов красная окраска обусловлена накоплением бетацианинов).

Одной из основных физиологических ролей антоцианов является защита ФСА от фотоингибирования и фотоповреждения. Существенный вклад в исследование оптических свойств антоцианов *in planta* и роли этих пигментов в защите от фотоповреждения внесли исследования, выполненные под руководством М.Н. Мерзляка. Для количественного описания вклада антоцианов в поглощение света ювенильными и стареющими листьями *in situ* используют сопоставление спектров листьев, существенно различающихся по содержанию антоцианов, но характеризующихся при этом близким поглощением Хл. На рис. 30, 31 приведены спектры поглощения листьев с близкими значениями поглощения Хл в красной области спектра.

На спектрах поглощения листьев (рис. 30, 31), наряду с выраженными полосами Хл и Кар (представленными в виде плеч в синей области), присутствуют детали, обусловленные соединениями с максимумом в ближней УФ области, предположительно флавонолам. Поглощение антоцианов, в зависимости от их количества, проявляется в виде полосы либо плеча в области 500–600 нм. На разностных спектрах поглощения ювенильных листьев *A. Platanoides* и *C. avellana* (рис. 31) практически не отличающихся по поглощению в области 620–700 нм, присутствуют полосы с максимумами при 540–544 нм, соответственно, обусловленные поглощением антоцианов. Кроме того, на разностных спектрах поглощения красных и зеленых ювенильных листьев присутствуют небольшие максимумы при 420 и 480

нм, принадлежащие Кар. Полосы поглощения антоцианов особенно выражены на спектрах красных осенних листьев (рис. 31, кривые 2).

Рис. 30. Спектры поглощения, $AB(\lambda) = -\log_{10}(T(\lambda)/[1 - R(\lambda)])$, зеленых (1) и красных (2) весенних листьев *A. platanoides* (а) и *C. avellana* (б) (по левой шкале) и их разностных спектров (3, по правой шкале).

Рис. 31. Спектры поглощения зеленых (1) и красных (2) осенних листьев *A. platanoides* (а), *P. quinquefolia* (б), *C. albaunica* (в), *C. alba* (г) и их разностные спектры (3); также показаны масштабированные спектры, $E(\cdot)$, вакуолей клеток, содержащих антоцианы (4).

Из представленных данных следует, что антоцианы оказывают большое влияние на поглощение света листьями и конкурируют с Хл, особенно Хл *b*, и Кар за поглощение квантов ФАР в зеленой области спектра. Для экранирующей функции антоцианов также существенно, что эти соединения сильно поглощают в зеленой области спектра: данный диапазон находится между полосами интенсивного поглощения фотосинтетических пигментов, поэтому излучение в зеленой области спектра глубже всего проникает в ткани листа. На рис. 32 представлены спектры молярной экстинкции представителей основных фотозащитных пигментов растительных организмов. Экранирующие пигменты позволяют растениям без риска повреждения восстанавливать баланс между донорными и акцепторными системами, который часто нарушается при различных неблагоприятных воздействиях.

Рис. 32. Спектры молярной экстинкции представителей основных фотозащитных пигментов.

В зависимости от характера воздействия изменения пигментного состава растительного организма носят сложный характер и зависят от физиологического состояния и генотипа растения. Можно выделить несколько стратегий фотоадаптации растений в неблагоприятных условиях. Большинство низших растений накапливают микоспорин-подобные аминокислоты и ограниченного числа простых фенолов либо фенилпропаноидов для защиты от УФ, а в экранировании от избытка ФАР принимают участие вторичные Кар. По химическому составу они обычно не отличаются от Кар из состава ФСА, например, β -каротин у *P. incisa* или *Dunaliella*. В некоторых случаях к ним добавляются кетокаротиноиды, не участвующие в фотосинтезе, такие как астаксантин у *Haematococcus*. Высшие растения отличаются большим разнообразием экранирующих соединений. Для них характерно множество различных стратегий фотоадаптации. Общей чертой всех исследованных видов высших растений является накопление флавоноидов и фенольных кислот, поглощающих в УФ области спектра. Защита от избытка ФАР обеспечивается либо повышением соотношения Кар/Хл в хлоропластах, либо накопление пигментов, поглощающих в сине-зеленой области спектра, как правило, антоцианов. У некоторых таксонов метаболические пути синтеза антоцианов, по неясным пока причинам, функционируют чрезвычайно слабо, в таких случаях накапливаются кетокаротиноиды (родоксантин) либо беталаины.

Информация о состоянии пигментного аппарата растительных организмов и, в частности, об оптическом экранировании УФ и ФАР может быть использована для экологического мониторинга состояния среды. Методы оптической спектроскопии позволяют определять состояние пигментного аппарата растительных организмов без предварительной подготовки образцов, а часто и не нарушая их целостности. Такие биофизические подходы являются чрезвычайно перспективными в экологических исследованиях.

6.6. Абсорбционные методы для оценки пигментов природного фитопланктона и растворенного в воде органического вещества.

Методы оптической спектроскопии давно и широко используются для исследования состояния биологических объектов. Применение новых электронно-оптических систем и мощный арсенал вычислительной техники значительно расширили возможности этих методов не только для использования в лабораториях, но и в полевых условиях.

Обилие фитопланктона, его таксономический состав и количество растворенного органического вещества (РОВ) входят в число основных показателей состояния водных экосистем. Оптические свойства морской воды определяются содержанием биологических частиц, минеральных взвесей и растворенных веществ, главным образом, органических. В связи с этим оптические методы являются эффективным инструментом для мониторинга пространственной и временной изменчивости содержания взвеси и растворенного органического вещества (РОВ) в различных акваториях океана.

Морские взвеси представляют собой смесь терригенных частиц, клеток фитопланктона, бактерий и детрита. Традиционные методы определения продукционных характеристик морских экосистем весьма трудоемки, нетехнологичны и недостаточно точны. Обилие водорослей определяют по содержанию в ХЛ *a* в спиртовом или ацетоновом экстракте осажденных на фильтр клеток из заданного объема воды. Измерение таксономического состава фитопланктона проводят путем определения видовой принадлежности и подсчета количества клеток водорослей под микроскопом. В настоящее время в океанологии отсутствуют прямые методы количественного определения РОВ и поэтому принято характеризовать его по оптическим свойствам. Сложность измерения показателя поглощения или оптической плотности морской воды обусловлены их малыми абсолютными значениями. Для проведения достоверных измерений можно

использовать устройства с большим оптическим путем. Однако при этом главную роль в ослаблении тестирующего светового потока играет рассеяние. В связи с этим продолжают поиски новых методов исследования морских экосистем, направленных на экспрессное определение обилия и таксономической принадлежности фитопланктона в составе взвеси, а также количества растворенного в морской воде органического вещества.

Широко принятым методом оценки обилия и пигментного состава фитопланктона по оптическим характеристикам фильтров, на которые осаждаются известные объемы проб воды. В результате этого удастся получить образцы, обладающие достаточным для спектрофотометрических измерений поглощением в видимой части спектра. Данный способ состоит в определении спектров поглощения частиц, осажденных из заданного объема морской воды на стекловолоконный фильтр. При этом из спектров поглощения фильтра с частицами вычитают спектр поглощения пустого фильтра. Измерения производят при помощи спектрофотометра с интегрирующей сферой, перед которой устанавливают фильтры (Рис. 33).

На рис. 34 представлены спектры поглощения стекловолоконных фильтров GF/F с иммобилизованными на них водорослями с различных горизонтов станции 1649 в 62 рейсе НИС «Акванавт» в Черном море в 2004 году. На спектрах поглощения фильтров воды, полученной с 30, 40 и 50 м в области около 540 нм прослеживаются максимумы, соответствующие фикоэретринам. Эти фикобелины характерны для цианобактерий.

Измерение оптической плотности в такой оптически сложной системе, где происходит рассеяние и значительно увеличивается длина оптического пути, не выполняется закон Ламберта-Бера. Вопрос о том, как соотнести оптические характеристики клеток в отобранных пробах с таковыми на фильтрах, окончательного решения до сих пор не получил. Согласно, получившим широкое практическое применение работам Митчелла (Mitchell 1990), для одноклеточных зеленых и диатомовых водорослей, а также цианобактерий, зависимости оптических плотностей суспензий, $A_s(\lambda)$, и клеток на фильтрах, $A_f(\lambda)$, нелинейны и могут быть описаны эмпирическим квадратным уравнением. Для стеклянных фильтров (GF/F фирмы Whatman) скорректированная функция поглощения суспензии, $A_s(\lambda)$, имеет вид:

$$A_s(\lambda) = 0.392 A_f(\lambda) + 0.665 [A_f(\lambda)]^2.$$

Поскольку измерения мутных образцов имеет свои ограничения, связанные с геометрическими особенностями регистрирующих систем и необходимостью полного сбора рассеянного света, очевидно, что уравнение Митчелла не является абсолютным. Сложный характер зависимостей между $A_s(\lambda)$ и $A_f(\lambda)$ не исчерпывается только компенсацией на величину оптической плотности, как было предложено в работах Митчелла и ряда других авторов. Для более точного сопоставления спектров поглощения должны быть использованы корреляционные функции, зависящие от длины волны, что может быть связано со спектральными особенностями поглощения и рассеяния клеток в водных суспензиях и при их иммобилизации на фильтрах. Несмотря на сложности интерпретации спектральной информации для такой сложной оптической системы спектры поглощения водорослей, иммобилизованных на фильтрах, дает ценные данные о составе пигментов фитопланктона.

На рис. 35 представлена зависимость оптической плотности фильтра GF/F на длине волны 673 нм от интенсивности флуоресценции хлорофилла в ацетоновом экстракте из фильтров. Результаты получены в 62 рейсе, НИС «Акванавт» в Черном море в 2004 году.

В течение последних десятилетий в литературе активно обсуждается возможность применения для измерения абсорбционных свойств воды т.н. измерителя поглощения в полости интегрирующей сферы (Integrating Cavity Absorption Meter, ICAM). Предполагается, что такие измерения дадут возможность оценить таксономический состав фитопланктона по поглощению его пигментов и количество РОВ. Существенными преимуществами использования интегрирующей сферы является отсутствие потерь света, обусловленных светорассеянием, и значительное увеличение чувствительности в результате многократного прохождения света через образец. Ряд авторов использовали устройства различной геометрии, с зеркальным или рассеивающим покрытием полости сферы и размещением источника света внутри или вне сферы. Сообщалось об использовании подобного подхода для анализа фитопланктона, а также РОВ в природных водах. Однако применение этого подхода требует специальной коррекции и калибровки, учитывающих отклонения от закона Ламберта-Бера, «искажение» измеряемых спектров по сравнению со стандартными спектрофотометрическими измерениями в плоскопараллельных кюветах, возможный вклад флуоресценции и присутствие примесей. Поэтому дополнительные сведения о специфических особенностях спектроскопии ICAM различных таксономических групп фитопланктона является необходимым условием для корректного применения такой методологии.

Оптическая схема устройства для измерения в полости интегрирующей сферы приведена на рис. 36. Пробы воды помещают в сферическую кварцевую колбу, помещенную во внутреннюю поверхность сферы, изготовленной из флуорилон (Fluorilon 99-WTM). В качестве источника полихромного излучения используют стабилизированную галогеновую лампу большой мощности, свет от которой, через коллиматор и комбинацию цветных светофильтров, установленных для выравнивания спектральной характеристики источника света, направляемого на входное окно интегрирующих сфер. Регистрация излучения, выходящего из интегрирующей сферы, через кварцевый световод проводят при помощи спектрометра USB-2000 (Ocean

Optics, Inc., США). Спектр ослабления излучения рассчитывается как $D(\lambda) = -\lg(I/I_0)$, где I и I_0 , соответственно, спектры излучения прошедшего через сферу, заполненную образцом и раствором сравнения (в различных экспериментах: среда культивирования микроводорослей, фильтрованная через фильтры GF/F (фирма «Whatman», Великобритания) морская вода, дистиллированная вода).

На [рис. 37](#) показаны спектры поглощения диатомовой водоросли *T. weissflogii*, измеренные в стандартной кювете и спектры, зарегистрированные в сфере. При измерениях в сфере не наблюдалось потерь света, обусловленных светорассеянием, о чем (в пределах экспериментальной точности) свидетельствовало отсутствие поглощения в области 750 – 800 нм. Увеличение количества клеток в сфере сопровождалось монотонным увеличением поглощения во всем спектральном диапазоне ([рис. 37](#)). Даже при очень низких плотностях суспензий $\tilde{A}$ пропорционально количеству клеток и форма спектров остается постоянной.

Применение ICAM обеспечивает высокую чувствительность оценки содержания пигментов. Наиболее высокая чувствительность измерений наблюдается при небольших количествах поглощающего материала, когда D не превышала 0.05–0.1 и пропорциональна концентрации клеток. В этом диапазоне эффективная длина оптического пути в сфере превосходит 1.5 м. При этом чувствительность определения хлорофилла составляла десятые доли мг на м³. При больших количествах материала обнаруживаются значительные отрицательные отклонения от линейной зависимости.

В качестве примера использования ICAM приведены результаты измерения спектров поглощения проб морской воды из Японского и Черного морей до и после фильтрации через волоконные стеклянные фильтры GF/F, задерживающих частицы размером более 0.7 мкм ([рис. 38](#)).

Стандартный протокол для спектрофотометрического анализа РОВ («желтого» вещества) предполагает измерения профильтрованных образцов в кюветах с длиной оптического пути 10 см. Применение ICAM позволило надежно регистрировать спектры образцов, полученных после фильтрации через фильтры GF/F ([рис. 38](#)). Спектры, записанные против дистиллированной воды, характеризовались присущим РОВ поглощением, монотонно возрастающим к коротким длинам волн. В спектрах фильтратов практически отсутствует поглощение в полосах основных пигментов фитопланктона. Тем не менее, трудно исключить определенного вклада в поглощение фильтрата нано- и пикопланктона, прошедшего через фильтр. Спектры поглощения образцов, отобранные на разных глубинах, мало различались между собой. Пробы, отобранные в Японском море, обладали значительно более высоким поглощением. Из представленных спектров следует, что в образцах из Японского моря поглощение РОВ около 400 нм сопоставимо, а в пробах из Черного моря – превосходит поглощение частиц, задерживаемых фильтром GF/F.

Спектры поглощения частиц морской воды существенно отличались от спектров культур водорослей. По-видимому, это обусловлено присутствием в природных водах, наряду с фитопланктоном, терригенных взвесей, а также других окрашенных частиц биологического происхождения. Спектры частиц из морской воды, зарегистрированные с помощью ICAM против фильтратов, характеризовались полосой поглощения хлорофилла в области 670–680 нм и также других пигментов при более коротких длинах волн. Образцы, отобранные в Японском море, обладали значительно более сильным поглощением с выраженными полосами около 500 и 550–560 нм. Таким образом, представленные данные свидетельствуют о перспективности использования техники ICAM для регистрации фитопланктона и РОВ непосредственно в пробах морской воды.

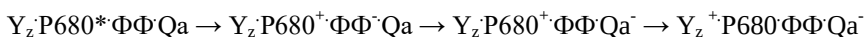
7. Регуляция первичных процессов фотосинтеза

7.1. Общая характеристика первичных процессов фотосинтеза

В 1970–80 гг. была показана универсальность структуры и функции РЦ всех известных фотосинтезирующих организмов. Первичные процессы фотосинтеза (ППФ) выполняют функцию преобразования энергии света в форму энергии конечных продуктов световой стадии фотосинтеза – НАДФН и АТФ. ППФ состоят из: поглощения света фотосинтетическими пигментами, миграции энергии возбуждения в реакционные центры фотосистем, фотохимического разделения зарядов и процессов переноса электронов по фотосинтетической цепи. ППФ сопряжены с запасанием энергии в виде химических связей восстановленных продуктов и АТФ. Весь комплекс ППФ полностью осуществляется во внутренних мембранах хроматофоров (у бактерий) или хлоропластов (у высших растений и водорослей). Возбужденный электрон специальной молекулы ХЛ РЦ передает первичному акцептору электронов. Образовавшийся в РЦ положительный заряд принимает электрон от донора. Таким образом, происходит преобразование энергии возбужденного электрона в энергию разделенных зарядов. У высших растений, водорослей и цианобактерий свет возбуждает две ФС, локализованные в мембране так, что донорная сторона ФС находится у внутренней поверхности мембраны, а акцепторная – у наружной. Фотосистема 1 (ФС1) и фотосистема 2 (ФС2) различаются по составу белков, пигментов и оптическим свойствам. Разделение зарядов в РЦ ФС2 и ФС1 индуцирует транспорт электронов по ЭПЦ. Фотохимически активные компоненты реакционных центров ФС1 и ФС2 названы P700 и P680 в соответствии с их максимумами поглощения при 700 и 680 нм. ФС2 и ее светособирающий комплекс располагаются преимущественно в мембранах гран в примембранных зонах с

низкой полярностью. ФС1 и связанный с ней антенный комплекс расположены, в основном, в ламеллах стромы, где полярность выше, чем вблизи гран.

Строение фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) показано на [рис. 39](#). Две фотосистемы связаны между собой цепью электронных переносчиков. Разделение зарядов в РЦ Р700 и Р680, инициированное светом, обеспечивает перенос электрона из системы разложения воды в ФС2 к конечному акцептору электронов – ФД и затем к НАДФ⁺. Цепь электронного транспорта, соединяющая две фотосистемы, в качестве переносчика электрона включает в себя молекулы пластохинона, электронтранспортный белковый комплекс (b₆/f – комплекс) и водорастворимый белок пластоцианин. В ФС2 электрон от возбужденного РЦ Р680* переносится на первичный акцептор феофитин, а затем на молекулу пластохинона Q_a, связанного ковалентно с белковыми субъединицами ФС2. Перенос электрона с Р680* на ФФ приводит к образованию Р680⁺. Р680⁺ получает электрон из системы разложения воды от тирозина (Y_z), входящего в состав белка D1. Ниже приведена схема протекания процесса разделения зарядов в ФС2:



Первая стадия этого процесса происходит за время $2-3 \cdot 10^{-12}$ с, вторая – за $2-3 \cdot 10^{-10}$ с, а третья за $2 \cdot 10^{-8}$ с.

Электрон от первичного хинонного акцептора Q_a⁻ переносится на молекулу пластохинона, способного диффундировать из белок-пигментного комплекса ФС2 в мембрану. Процесс переноса электрона от Q_a⁻ протекает в Q_b – сайте белка ФС2. Молекула пластохинона, находящаяся в сайте связывания называется Q_b. Для полного восстановления молекулы Q_b необходимо два электрона и два протона, которые она захватывает из стромального пространства и превращается в пластохинол – QH₂. В таком состоянии он покидает сайт Q_b и оказывается в мембране, а вакантное место занимает окисленный хинон из мембранного пространства. Дважды восстановленный и протонированный пластохинол играет роль подвижного переносчика, обеспечивая электронный транспорт между ФС 2 и цитохромным b₆/f – комплексом. При участии b₆/f – комплекса пластохинол окисляется до хинона, восстанавливает пластоцианин и переносит в люмен два протона. В мембране тилакоида находится 5-10 молекул хинона. Их принято называть пулом хинонов и обозначать PQ.

В состав ФС2 входит водоразлагающий комплекс, содержащий в активном центре марганцевый кластер. Радикал Р680⁺, образованный в результате разделения зарядов в РЦ ФС2, окисляет вторичный донор электронов. Этим донором является редокс-активный остаток тирозина Y_z, входящий в состав белка D1. В свою очередь окисленный переносчик электронов Y_z окисляет марганцевый кластер. В Mn-содержащем активном центре образуется 2 иона Mn⁴⁺, которые обеспечивают разложение 2-х молекул воды. При этом во внутритилакоидное пространство выделяются 4 протона и молекула кислорода.

Пластохинон, восстановленный в ФС2, связывается b₆/f – комплексом и отдает ему два электрона. Выделение 2-х протонов при окислении пластохинона происходит во внутритилакоидное пространство. Цитохром f восстанавливает пластоцианин – небольшой гидрофобный медьсодержащий белок с молекулярной массой 10,5 кДа (ПЦ), который выполняет роль связующего звена между b₆/f – комплексом и ФС1. От ПЦ электрон передается к окисленному реакционному центру ФС1 – Р700⁺. В результате совместного действия ФС1 и ФС2 два электрона через цепь электронного транспорта переносятся на молекулу ФД и затем на НАДФ⁺. При этом образуются сильные восстановители ФД и НАДФН.

ФД является высокопотенциальным переносчиком электрона, способным к восстановлению многих соединений. Он может передавать электроны на НАДФ⁺ для его восстановления. Такой путь называется нециклическим транспортом электрона. ФД может восстанавливать b₆/f – комплекс, образуя циклический транспорт электронов вокруг ФС1. ФД может также восстанавливать молекулярный кислород до супероксидного анион-радикала. Этот путь называется псевдоциклическим или реакцией Меллера.

Восстановленный НАДФН необходим организму для ряда синтетических функций и, в частности для синтеза углеводов из CO₂ в цикле Кальвина. Прохождение электронов по электрон-транспортной цепи сопряжено с переносом протонов из стромального пространства в люмен. Большая часть энергии, накапливаемой в форме градиента водородных ионов (ΔpH), используется для работы АТФ-синтазы. При переносе через АТФ-синтазу протонов из тилакоида в строму происходит синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата.

Достижения мировой наукой за последние годы успехи в изучении молекулярных механизмов первичных процессов, показали, что это сложная, особым образом организованная динамическая система, которая должна иметь соответствующие механизмы регуляции на разных уровнях, чтобы подстроиться к метаболизму растительного организма, постоянно испытывающему влияние изменяющейся внешней среды.

Главная особенность ППФ состоит в том, что начальные этапы переноса электрона и восстановление первичного акцептора происходят в РЦ за несколько пикосекунд ($2 \cdot 10^{-12}$ с). Это обстоятельство обуславливает почти 100% эффективность начального разделения зарядов в фотосинтезе, поскольку оно происходит намного быстрее, чем испускание света флуоресценции отдельными возбужденными молекулами ХЛ в растворе ($5 \cdot 10^{-9}$ с).

Общее время переноса электрона и появления конечных продуктов световой стадии (НАДФН и АТФ), составляет $\sim 10^{-1} - 10^{-2}$ с, что близко к временам протекания обычных ферментативных процессов. За этот период времени электрон переносится на большие межмолекулярные расстояния через мембрану с участием нескольких крупных подвижных макромолекулярных комплексов.

7.2. Особенности регуляции системы ППФ

В естественных условиях растения подвергаются окислительному повреждению. Ведущими факторами, определяющими физиологическое состояние растений, являются температура, содержание биогенных элементов в среде, освещенность и различные виды загрязнений. Интенсивность ФАР определяет скорость ППФ и скорость роста клеток. В то же время свет высокой интенсивности вызывает повреждение мембран, разрушение фотосинтетических пигментов и приводит к гибели организма.

Система ППФ обладает структурно-функциональной сложной, автономией организацией, дающей возможности для адаптации к различным условиям облучения и регуляции своего состояния. Различные внутренние и внешние факторы влияют на первичные процессы фотосинтеза, включая изменения миграции энергии на уровне антенного комплекса и перестройку фотосинтетической ЭТЦ. Срочная адаптация состояния фотосинтетического аппарата к меняющимся условиям освещения проходит за времена от долей секунд до минут.

Под регуляцией подразумевается направленная перестройка системы с сохранением ее интегральной целостности для обеспечения оптимального функционирования при изменении внешних и внутренних условий. Механизмы регуляции условно можно разделить на «медленные» и «быстрые». «Медленная» регуляция ФСА предполагает изменение структуры хлоропласта и его компонентов, обусловленное синтезом новых белков и липидов. «Быстрая» регуляция происходит за счет изменения условий переноса энергии в антенных комплексах или констант скоростей взаимодействия элементов ЭТЦ, например, вследствие изменения их конформационного состояния. Такая регуляция обеспечивает нормальную работу ФСА в изменяющихся условиях и не связана с синтезом новых веществ.

Изменение интенсивности падающего света или его спектрального состава отражается на скорости фотохимических реакций в ФС1 и ФС2. В то же время, в ЭТЦ хлоропластов есть и такие окислительно-восстановительные реакции, протекание которых практически не зависит от света, но сильно зависит от температуры. Слишком быстрое протекание реакций на одном участке ЭТЦ по сравнению с другими участками приводит к избыточному восстановлению соответствующих переносчиков электрона. При накоплении восстановленных переносчиков возрастает вероятность образования активных форм кислорода, что ведет к повреждению ФСА. Таким процессам в норме противостоит система регуляции фотосинтеза, которая в меняющихся условиях обеспечивает согласованное протекание окислительно-восстановительных реакций в ФС2, ФС1 и связывающей их ЭТЦ.

Важную роль в регуляции состояния переносчиков ЭТЦ играет пул хинонов. Трансмембранный перенос электронов и протонов пулом хинонов протекает по диффузионному механизму и, в силу этого, сильно ограничен по скорости. Кроме того, степень восстановленности хинонов в пуле определяется динамическим равновесием между скоростями поступления восстановленных хинонов от ФС2 и их окислением за счет ФС1. Одним из путей снижения восстановленности ЭТЦ на уровне пула хинонов является перенос части тримерных ССК от ФС2 на ФС1. Этот процесс происходит при избытке АТФ в результате фосфорилирования ССК. Така модификация ССК имеет более высокую полярность по сравнению с нефосфорилированными комплексами. Отрицательный заряд, получаемый основным полипептидом ССК при присоединении фосфатной группы специальной киназой, вызывает его латеральную миграцию к ФС1. Это приводит к перераспределению вкладов ФС2 и ФС1 в пользу последней и, в частности, к увеличению вклада циклического электронного транспорта. В активировании киназы ведущую роль играет редокс-состояние переносчиков электронов. Пока цитохромный комплекс восстановлен, фосфатаза «заблокирована», после его окисления фосфатаза активируется и дефосфорилирует фосфорилированные белки, в том числе и ССК. После дефосфорилирования ССК диффундирует обратно и вновь ассоциируется с ФС 2, увеличивая ее сечение поглощения. Так происходит регуляция ЭТЦ, обеспечивающая оптимальное соотношение циклического и нециклического потока электронов и защиту ФСА от фотоокисления.

Важную роль в обеспечении эффективной работы ЭТЦ и поддержании оптимальных для каждой конкретной ситуации редокс-состояний участников электротранспортных процессов играет ФД. Он является ключевым компонентом альтернативных метаболических путей, связанных с восстановлением разных акцепторов ФС1. ФД в восстановленной форме служит донором электронов не только для НАДФН, но и для систем восстановления окисленных форм азота, серы, а также молекулярного кислорода. Наличие большого числа терминальных акцепторов открывает дополнительные возможности для регуляции электронного потока и систем ассимиляции CO_2 и азота, что необходимо для обеспечения процессов синтеза белка в хлоропласте. Кроме того, существование альтернативных путей сброса электронов препятствует «перевосстановлению» компонентов, поддерживая их в определенном редокс-состоянии.

В тех случаях, когда при интенсивных световых потоках система регуляции ППФ оказывается не в состоянии предотвратить избыточное восстановление пула хинонов, в комплексе ФС2 развивается фотоингибирование. Оно проявляется в инактивации РЦ и в снижении максимальной скорости электронного транспорта, создаваемой ФС2. Показано, что инактивация комплекса ФС2 связана с протеолитической деградацией белка D1. Согласно экспериментам, проведенным *in vitro*, фотоингибирование сопровождается генерацией синглетного кислорода и свободных радикалов. Фотоингибирование может быть обратимым «динамическим» и необратимым «хроническим». При

динамическом фотоингибировании поврежденные РЦ восстанавливаются через серию реакций: разложение белка D1, синтез его *de novo* и сборку нового РЦ.

В тилакоидных мембранах конечный этап преобразования энергии, заключенной в градиенте протонов, происходит в работе полипептидного комплекса АТФ-синтазы. АТФ-синтаза участвует в образовании АТФ и контролирует через рН внутритилакоидного пространства и электронный транспорт. Таким образом, АТФ-синтаза участвует в регуляции образования другого богатого энергией соединения — восстановленного НАДФ. АТФ-синтазный комплекс тилакоидных мембран занимает ключевое положение в системе регуляции энергообеспечения растительного организма.

Одним из важнейших свойств АТФ-синтазы является ее обратимая инактивация при снижении трансмембранной разности электрохимических потенциалов протонов (энергезависимая регуляция). Инактивация АТФ-синтазы предохраняет от непроизводительного гидролиза запас АТФ, синтезированного в условиях достаточного притока энергии. Известны два механизма регуляции АТФ-синтазы: тиол- и нуклеотид-зависимый. В основе тиол-зависимого механизма регуляции лежит окислительно-восстановительное состояние γ -субъединицы CF₁. В окисленном состоянии снижение освещенности вызывает резкое падение синтеза АТФ и возникновение дисбаланса между соотношением АТФ и НАДФН. В этих условиях постепенное накопление

восстановительного потенциала в результате работы электрон-транспортной цепи приводит к восстановлению стромального белка тиоредоксина *f*, который, в свою очередь, восстанавливает дисульфидную связь между цистеиновыми остатками Cys199 и Cys205 γ -субъединицы, переводя АТФ-синтазу в демаскированное состояние. В режиме синтеза АТФ такое состояние обеспечивает достаточную скорость фотофосфорилирования даже при незначительной освещенности, при которой в окисленном состоянии γ -субъединицы синтез приостанавливается. В режиме гидролиза АТФ, который становится термодинамически возможным при падении трансмембранного потенциала (деэнергизации мембраны), восстановление γ -субъединицы АТФ-синтазы приводит к увеличению активности фермента в 10–15 раз. Прекращение электронного транспорта в темноте вызывает окисление тиоредоксина и образование дисульфидного мостика между указанными цистеиновыми остатками. В тиол-зависимой регуляции фермента

принимает также участие ϵ -субъединица, которая экранирует дисульфидную связь γ -субъединицы при деэнергизации мембраны. В окисленном состоянии фермента С-концевой α -спиральный участок вращающейся ϵ -субъединицы взаимодействует с С-концевым участком одной из неподвижных β -субъединиц, препятствуя вращению «роторной» части АТФ-синтазы, тем самым подавляя активность фермента. В восстановленном состоянии γ -субъединицы взаимодействие ϵ -и β -субъединиц ослабляется и фермент реактивируется.

В тилакоидных мембранах кроме тиол-зависимой регуляции активности АТФ-синтазы существует нуклеотид-зависимый механизм регуляции этого фермента. После предварительной активации АТФ-синтазы тилакоидных мембран освещением

в присутствии тиолов, введения АТФ в среду и выключения света наблюдается гидролиз

АТФ. Аналогичный процесс наблюдается при иницировании гидролиза АТФ введением в среду ионов магния. Обнаружена корреляция между инактивацией и прочным связыванием с ферментом образующегося в реакции АДФ (Minkov et al., 1979; Bar-Zwi and Shavit, 1982; Drobinskaya et al., 1985). При моделировании процесса инактивации на изолированном сопрягающем факторе хлоропластов методом предстационарной кинетики показано, что инактивация обусловлена дифференциацией свойств трех каталитических центров: один из них прочно связывает MgADP, другой — MgATP, тогда как третий теряет сродство к нуклеотидам (Malyan and Vitseva, 1990). Аналогичный вывод сделан на основании рентгеноструктурного анализа сопрягающего фактора митохондрий F₁ (Abrahams et al., 1994). При возрастании трансмембранного потенциала протонов происходит активация фермента, сопровождаемая диссоциацией прочно связанного ADP (Lohse and Strotmann, 1989). Считается, что способность к прочному связыванию MgADP и, соответственно, к инактивации в значительной степени определяется асимметричным взаимодействием γ -субъединицы с β -субъединицами F₁: препараты F₁ с удаленной γ -субъединицей не инактивировались MgADP (Sokolov and Gromet-Elhanan, 1996). С другой стороны, в экспериментах с F₁ хлоропластов, митохондрий и бактерий (Milgrom et al., 1990, 1993; Murataliev and Boyer, 1992; Jault and Allison, 1993; Matsui et al., 1997), а также и с АТФ-синтазой хлоропластов (Пронин и Мальян, 2009) показано, что прочность связи MgADP с каталитическими центрами и, соответственно, степень инактивации снижаются при связывании АТФ с некаталитическими центрами. И наоборот при утрате способности некаталитических центров к связыванию нуклеотидов, вызываемой направленным мутагенезом входящих в этот центр аминокислотных остатков, утрачивалось

и реактивирующее действие АТФ (Matsui et al., 1997; Amano et al., 1998). Обнаружено также влияние каталитических центров на некаталитические — некоторое снижение скорости заполнения некаталитических центров нуклеотидами при MgADP-зависимой инактивации фермента (Milgrom et al., 1991). Эти данные указывают, что способность к инактивации может изменяться, причем в модуляции этой способности участвуют некаталитические центры F₁-АТФаз. Влияние некаталитических центров на синтез АТФ менее драматично. С другой стороны ковалентное связывание аналога АТФ в некаталитических центрах АТФ-синтазы хлоропластов приводило к полному прекращению синтеза АТФ (Possmayer et al., 2001).

Главной целью регуляции состояния ЭТЦ является не только повышение эффективности использования поглощенной энергии света ФСА, но и создание условий для снижения скорости генерации АФК. Можно предполагать, что именно наличие гибкой системы регуляции предотвращает развитие окислительных повреждений за счет создания оптимального состояния ЭТЦ, при котором нет избытка или недостатка электронов или энергии возбуждения как источников образования АФК.

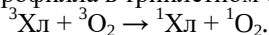
7.3. Окислительное повреждение фотосинтетического аппарата.

Образование АФК в тилакоидных мембранах (Б.Н.Иванов и др., 2014)

В тилакоидных мембранах образуются все формы активного кислорода. Значительная генерация синглетного кислорода возможна только в этих мембранах, поскольку в них сосредоточены молекулы хлорофилла. Также в тилакоидных мембранах, в состав липидов которых входят жирные кислоты, наиболее вероятно образование пероксильных радикалов и гидропероксидов. Переносчики фотосинтетической электро-транспортной цепи в тилакоидных мембранах, имеющие достаточно низкий окислительно-восстановительный потенциал способны восстанавливать молекулы кислорода до супероксидного анион-радикала. $O_2^{\cdot -}$, образовавшийся с участием мембранных переносчиков, в реакции дисмутации может превращаться в H_2O_2 . Образование H_2O_2 может происходить и путем восстановления $O_2^{\cdot -}$ переносчиками электрон-транспортной цепи. Распад перекиси водорода может приводить к образованию гидроксильного радикала.

Ингибирование фотосинтеза в неблагоприятных для растительных организмов условиях, и в частности фотоингибирование, связано в основном с ФС2. Многие исследователи пришли к выводу, что этот процесс протекает с участием АФК. В нормальных физиологических условиях в ФС2 перенос энергии возбуждения хлорофилла и электронов от восстановленных переносчиков электрон-транспортной цепи на кислород в значительной степени ограничен.

Синглетный кислород в хлоропластах образуется в основном при взаимодействии 3O_2 с молекулой хлорофилла в триплетном состоянии:



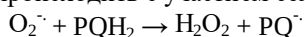
Триплет-триплетный перенос энергии от 3Xл на 3O_2 происходит очень эффективно в растворах близка квантовый выход этого процесса по данным А.А.Красновского мл. достигает 80%. Имеются два пункта образования 3Xл в ФС2: в антенных пигмент-белковых светособирающих комплексах (ССК) из синглетного возбужденного состояния в триплетное в результате внутренней конверсии и образование 3P680 в результате рекомбинации зарядов в реакционном центре. Однако в ССК чрезвычайно эффективно происходит синглет-синглетный перенос энергии возбуждения с одной молекулы на другую, что предотвращает образование 3Xл . Кроме того, ССК ФС2 содержат каротиноиды, которые вследствие триплет-триплетного переноса энергии на них от 3Xл уменьшают время его жизни и вероятность его реакции с 3O_2 . Квантовый выход генерации 1O_2 в хлоропластах составляет около 0.1% (по оценкам А.А.Красновского мл.). Образование долгоживущего 3Xл в антенных комплексах, в основном, происходит в случае, где молекулы Хл и каротиноидов слабо друг с другом, что приводит к снижению эффективности его дезактивации. Образование 1O_2 в антенных комплексах было показано, по-видимому, в большей степени является следствием повреждений при выделении этих комплексов.

Взаимодействие 3O_2 с триплетным хлорофиллом в реакционном центре, видимо, является основным путем генерации синглетного кислорода в ФС2. В реакционном центре триплетное состояние хлорофилла, образующееся в результате рекомбинации заряда в паре $P680^+Feo^-$, является наиболее вероятным источником синглетного кислорода.

По мнению Асада (Asada, 1994) супероксидный радикал в ФС2 *in vivo*, а также в изолированных интактных хлоропластах и неповрежденных тилакоидах не образуется на свету в заметных количествах. Видимо, низкая скорость генерации $O_2^{\cdot -}$ в ФС2 приводит к тому, что H_2O_2 и $HO^{\cdot}$ также генерируются с очень малой вероятностью.

В ФС2 могут накапливаться органические пероксиды за счет процессов, инициируемых непосредственно реакциями в этой фотосистеме. В суспензии мембран ФС2 на свету наблюдается небольшое поглощение кислорода, не связанное с восстановлением O_2 до $O_2^{\cdot -}$. Имеются предположения, что поглощение кислорода происходит в результате взаимодействия молекул O_2 с радикалами, образующимися при окислении органических молекул вблизи донорной стороны ФС2 сильнейшим биологическим окислителем $P680^+$. Реакция этого радикала с молекулой O_2 продуцирует радикал $ROO^{\cdot}$, которые могут превратиться затем в гидропероксид $ROOH$. Образование гидропероксидов на донорной стороне ФС2 было показано при помощи специфической флуоресцентной метки для этих соединений.

PQ-пул тилакоидных мембран, помимо того, что служит одним из ключевых звеньев электрон-транспортной цепи, может быть также местом генерации $O_2^{\cdot -}$ и H_2O_2 . Восстановление O_2 до $O_2^{\cdot -}$ в этом пуле может происходить с участием семихинонов $PQ^{\cdot -}$, а образование перекиси водорода протекает по реакции:



Однако, по мнению Б.Н.Иванова в нормальных условиях такие процессы маловероятны. Они могут приобретать значение только в условиях нарушения фотосинтетической цепи переноса электронов.

Главным участком фотосинтетической цепи переноса электронов, на котором происходит перенос электронов к кислороду, является акцепторная сторона ФС 1. Благодаря низким окислительно-восстановительным потенциалам восстанавливать O_2 способны все переносчики электрона, расположенные в акцепторной части ФС1. Большинство этих переносчиков имеют очень малое время жизни в восстановленном состоянии и не способны в нормальных условиях образовывать значительные количества АФК. Наиболее вероятным источником АФК представляется реакция Мелера (псевдоциклический транспорт электрона), при которой происходит восстановление O_2 до $O_2^{\cdot -}$ за счет ферредоксина.

Окислительное повреждение фотосинтетического аппарата растений при блокировании его системы транспорта электронов обусловлена высокой концентрацией кислорода при большом времени пребывания переносчиков электронов в восстановленном состоянии. Кроме того, блокирование цепи переноса электронов приводит к закрытию реакционных центров и увеличению времени жизни возбужденных молекул хлорофилла, которые из синглетного состояния переходят в триплетное возбужденное состояние. В результате триплет-триплетного взаимодействия хлорофилла с кислородом образуется синглетный кислород.

Окислительное повреждение ФСА растений происходит под влиянием многих неблагоприятных факторов среды. Как правило, такое повреждение происходит под действием света. Реакции ФСА растения, находящегося в неблагоприятных условиях при небольших естественных интенсивностях света, мало отличается от эффектов действия света близкой или даже большей по интенсивности, чем при максимальной инсоляции в природе при прочих оптимальных для растения условиях. Таким образом, действие света высокой интенсивности на ФСА растения имитирует влияние неблагоприятных условий в природе, когда скорость электронного транспорта по какой-либо причине ограничена.

На начальных этапах действие света высокой (насыщающей фотосинтез) интенсивности приводит к избыточному восстановлению компонентов фотосинтетической ЭТЦ, высокому значению градиента концентрации H^+ на мембране тилакоидов, избытку АТФ и НАДФН. В результате регуляции на уровне первичных механизмов фотосинтеза происходит тушение возбужденных состояний пигментов антенных комплексов за счет высокой энергизации фотосинтетических мембран, дезоксидирования ксантофилов и переноса части свтособирающих белок-пигментных комплексов с ФС2 на ФС1. Эти светоиндуцированные обратимые структурные изменения тилакоидных мембран направлены на снижение скорости восстановления переносчиков акцепторной части ФС2 и ускорению потока электронов на уровне ФС1, что способствует снижению уровня восстановления промежуточных переносчиков и, соответственно, снижению скорости генерации $O_2^{\cdot -}$. В случае если интенсивность света соответствует возможностям системы регуляции первичных процессов фотосинтеза, время жизни восстановленных переносчиков становится небольшим, а скорость генерации $O_2^{\cdot -}$ оказывается на относительно низкой, когда системы защиты успевают инактивировать АФК. Если интенсивность света такова, что система регуляции не способна оптимизировать поток электронов по ЭТЦ и скорость генерации $O_2^{\cdot -}$ высока, образующиеся АФК инициируют процессы ПОЛ и деструкцию белков. В результате этих процессов нарушаются барьерные функции фотосинтетических мембран и происходит ускорение деструкции белка D1 ФС2. При этом снижение величины ΔpH уменьшает величину нефотохимического тушения возбужденных состояний ХЛ и тем самым увеличивает приток электронов в ЭТЦ, но за счет разобщения увеличивает скорость транспорта электронов и снижает степень восстановления переносчиков. Частичная деструкция белка D1 ФС2 предотвращает восстановление ЭТЦ и, соответственно, генерацию $O_2^{\cdot -}$ в данном РЦ, но при этом увеличивает вероятность генерации синглетного кислорода, так как в этих условиях не происходит нефотохимического тушения возбужденного состояния пигментов антенного комплекса. Продолжительное облучение объекта светом высокой интенсивности приводит к полному блокированию фотосинтетической ЭТЦ в результате деструкции белков РЦ. Возможно, наибольшее значение в этих процессах имеет взаимодействие белков РЦ с окисленным первичным донором электронов $P680^+$. Взаимодействие белков $P680^+$ с РЦ приводит к его деградации, но при этом такой РЦ выступает тушителем возбужденных состояний хлорофилла антенного комплекса. В условиях разобщения всех компонентов системы транспорта электронов ФСА дальнейшие процессы фотоокислительной деградации фотосинтетических пигментов происходят за счет фотодинамического действия ХЛ. Таким образом, окисленные РЦ за счет тушения возбужденных состояний ХЛ снижают скорость генерации синглетного кислорода и несколько затормаживают процессы окислительной деградации всех компонентов ФСА. На этой стадии происходит значительное накопление продуктов ПОЛ. В таких условиях процесс фотоокислительной деградации может замедлиться только за счет снижения содержания в объекте ХЛ по мере его разрушения. Описанные выше стадии окислительного повреждения растительных организмов можно определить по изменениям во времени показателей флуоресценции ХЛ после перенесения растений в условия низкой освещенности.

К настоящему времени накоплен большой экспериментальный материал показывающий, что нарушение работы ФСА часто обусловлено ускорением протекания окислительных процессов. Общепринятыми являются представления о повреждении ФСА при ускорении генерации АФК в нескольких участках фотосинтетической ЭТЦ, а также за счет фотодинамического действия ХЛ. В ходе окислительного повреждения фотосинтетических мембран накапливаются продукты взаимодействия АФК с ненасыщенными липидами. При этом образуются перекиси липидов, МДА и продукты его взаимодействия с

липидами и белками. Содержание этих продуктов ПОЛ характеризует скорость образования АФК, обусловленную нарушениями регуляции работы ФСА. В то же время сами АФК и продукты ПОЛ оказывают большое влияние на функционирование ФСА. В связи с этим весьма важным представляется исследование взаимосвязи процессов окислительного повреждения, наблюдаемого по накоплению продуктов ПОЛ и деградации пигментов, с нарушениями функциональной активности ФСА, регистрируемой флуорометрическими методами.

Было установлено, что ПОЛ мембранных структур высших растений может быть инициировано мембрансвязанными ферментными системами растительной клетки при участии восстановленных пиридиннуклеотидов в присутствии ионов двухвалентного железа. Непосредственно в процессах ПОЛ, инициированных ферментными системами, не происходит нарушения функциональной активности ФСА хлоропластов. Видимо, это обусловлено малым временем жизни и, соответственно, малыми (порядка толщины мембраны) пробегами свободнорадикальных форм кислорода и синглетного кислорода, а также чрезвычайно мощной системой защиты хлоропластов и фотосинтетических мембран от АФК и продуктов их взаимодействия с белками и липидами. Перекисное окисление мембранных липидов цитоплазматического ретикулума и цитоплазмы приводят ко многим нарушениям нормального функционирования растительной клетки. Такие изменения метаболизма приводят к изменениям состояния ФСА не сразу, а через несколько часов после обнаружения продуктов ПОЛ в мембранных структурах клетки.

7.4. Диссипация энергии света как механизм защиты растений.

Процессы фотосинтеза требуют энергии света, присутствия воды, CO_2 и основных биогенных элементов. Поглощение света фотосинтетическими пигментами пропорционально интенсивности света. При этом фотосинтетическая продукция является нелинейной функцией от интенсивности света. Почти весь поглощенный свет используется для фотосинтетических реакций только при очень низкой интенсивности света. При более высоких интенсивностях света дефицит биогенов или недостаток CO_2 ограничивают возможности ФСА усваивать энергию, поглощенную пигментами. В этом случае избыток поглощенной энергии может приводить к образованию АФК, которые способны привести к окислительной деструкции ФСА и растительный организм в целом. При этом возбужденные состояния ХЛ ФСА подвергаются нефотохимическому тушению. Известно несколько механизмов нефотохимического тушения возбужденных состояний ХЛ. Основной причиной, приводящей к нефотохимическому тушению, являются высокий градиент концентрации протонов на фотосинтетической мембране. Значительную роль в процессах, ведущих к рассеянию избытка света, играют изменения каротиноидов ксантофиллового цикла. При интенсивном облучении достигается высокий градиент водородных ионов и, следовательно, сильно понижается рН люмена. В этих условиях изменяется соотношение ксантофиллов, в частности, происходит увеличение содержания зеаксантина за счет снижения уровня виолксантина у высших растений и зеленых водорослей, а у диатомовых и ряда других водорослей из диатиноксантина образуется диатоксантин. Вместе с этим происходит протонирование PsbS-белка в антенне ФС2. Формирование комплекса между протонированным PsbS-белком и зеаксантином сдвигает поглощение зеаксантина в более длинноволновую область спектра. Это приводит к образованию диссипативных центров, способных эффективно конкурировать с открытыми РЦ ФС2 за энергию возбуждения. Детальный механизм этого явления еще предстоит выяснить. Тушение возбужденных состояний ХЛ снижает поток электронов в цепи электронного транспорта ФСА. Другим путем снижения загрузки фотосинтетической системы транспорта электронов является перенос части тримерных ССК от ФС2 на ФС1. Этот процесс происходит при избытке АТФ в результате фосфорилирования ССК.

Выживание высших растений при обезвоживании, как правило, невозможно. В тоже время многие виды мхов, лишайников и аэрофильных водорослей переносят полное высушивание и при наступлении благоприятных условий переходят к нормальной жизнедеятельности. В сухом состоянии эти организмы, естественно, не способны к фотосинтезу и при этом могут подвергаться очень высокой инсоляции без потери способности к восстановлению. Предполагается, что потеря воды во время обезвоживания приводит к конформационным изменениям белка ФС2, которые превращают его в диссипативный центр. В результате этого функционирующие РЦ ФС2 превращаются в нефункционирующие. Видимо, эти изменения происходят в непосредственной близости от самого РЦ. Детали молекулярных механизмов защиты ФСА мхов пока неизвестны.

7.5. Особенности фотосинтеза цианобактерий.

Клетки цианобактерий имеют развитую систему внутрицитоплазматических мембран (тилакоидов) с компонентами фотосинтетического аппарата, аналогичными тем, которые присутствуют у высших растений и водорослей. Особенностью цианобактерий является способность к бескислородному фотосинтезу, связанная с отключением ФС2 при сохранении активности ФС1. В этих условиях у них возникает потребность в иных, чем вода, донорах электронов. В таких условиях синтез АТФ сопряжен только с циклическим электронным транспортом, связанным с ФС1. Активность фиксации CO_2 за счет этого процесса существенно ниже, чем в условиях функционирования обеих фотосистем. Способность цианобактерий переключаться при изменении условий с одного типа фотосинтеза на другой служит иллюстрацией гибкости их светового метаболизма, имеющей важное экологическое значение (А. В. Вершубский, А.Н.Тихонов; 2014).

Пигментный аппарат цианобактерий и растений существенно отличаются. Эти отличия определяют особенности путей диссипации энергии у цианобактерий. Антенна цианобактерий (и красных водорослей) содержит фикобилипротеины, организованные во внемембранных структурах, фикобилисомах. Фикобилисомы расположены на поверхности тилакоидных мембран и состоят из ядра и цилиндров, состав которых зависит от вида цианобактерий. Цилиндры фикобилисом дикого типа *Synechocystis* sp. PCC 6803 состоят из 324 молекул фикоцианинов, а ядро содержит 66 молекул аллофикоцианинов, которые существуют в виде тримеров. Хромофорные белки ArcD и Lcm являются терминальными акцепторами энергии и участвуют в передаче поглощенной энергии от фикобилисом к антенным хлорофиллам фотосистем. Такая организация пигментного аппарата цианобактерий облегчает эффективную передачу поглощенной энергии света от цилиндров к ядру, то есть от фикоцианинов к аллофикоцианинам и далее к фотосистемам. Фикобилисомы, связанные с мембраной через липиды, способны к латеральной диффузии по поверхности тилакоидной мембраны. Так как у цианобактерий ксантофиловый цикл отсутствует, долгое время считалось, что цианобактерии не способны к нефотохимическому тушению с участием каротиноидов, который был обнаружен и детально исследован у высших растений и водорослей. Недавно работами Н.В. Карапетяна с сотрудниками открыт новый механизм диссипации энергии у цианобактерий — индуцированное каротиноидом тушение флуоресценции фикобилисом. Было установлено, что это тушение флуоресценции у цианобактерий происходит с участием связанного с белком каротина 3'-гидроксиэхиненона, или водорастворимого оранжевого каротинсвязывающего белка (ОСР). Освещение клеток *Synechocystis* синезеленым светом, поглощаемым этим каротиноидом, индуцирует диссипацию энергии, поглощенной ФБС.

8. Методы определения состояния фотосинтетического аппарата

8.1. Флуоресценция ХЛ ФСА.

Большая часть энергии поглощенных фотосинтетическими пигментами квантов света используется в процессах фотосинтеза. У фотоавтотрофных организмов энергия возбуждения всех пигментов, ассоциированных в ФСА, передается на ХЛ *a* или бактерио-ХЛ *a*. Такая передача энергии происходит потому, что из всех пигментов ХЛ *a* или бактерио-ХЛ *a* имеют самые низкие энергетические уровни возбужденного состояния по сравнению с другими пигментами, ассоциированными в ФСА. Неиспользованная часть световой энергии переходит в тепло или излучается в виде флуоресценции. Вспомогательные пигменты *in vivo* не флуоресцируют из-за быстрой миграции энергии возбуждения на ХЛ *a*. Исключением из этого правила составляют фикобилипротеины. Они обладают собственной флуоресценцией. В спектре флуоресценции цианобактерий и красных водорослей кроме ХЛ *a* может присутствовать излучение от фикобилинов. Соотношение флуоресценции фикобилинов и ХЛ определяется тем, насколько эффективна миграция энергии возбуждения с фикобилинов на ХЛ. Спектры флуоресценции высших растений и водорослей в красной области спектра соответствуют флуоресценции ХЛ *a*. При физиологических температурах в спектре флуоресценции присутствует в основном полоса с максимумом 685 нм, принадлежащая антенному ХЛ ФС 2.

ХЛ *a* в органических растворителях обладает квантовым выходом флуоресценции около 20-30%. ХЛ в составе ФСА передает энергию возбуждения в РЦ. Разделение зарядов в РЦ, за счет которого протекает процесс фотосинтеза, уменьшает количество возбужденных состояний. Такое явление называется фотохимическим тушением возбужденных состояний.

Процесс диссипации энергии возбуждения ХЛ происходит по трем путям: тепловому с мономолекулярной константой k_d , флуоресцентному с мономолекулярной константой k_f и фотохимическому переносу электрона на первичный акцептор с мономолекулярной константой k_p .

Квантовый выход флуоресценции ХЛ *a* ФСА соответствует: $\eta = \frac{k_f}{k_f + k_d + k_p}$

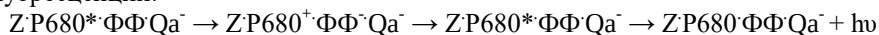
В условиях, когда процесс переноса электрона от возбужденного состояния ХЛ на первичный акцептор

невозможен и $k_p=0$, квантовый выход флуоресценции ХЛ увеличивается до $\eta_m = \frac{k_f}{k_f + k_d}$.

Около 90% флуоресценции ХЛ фотосинтезирующих объектов исходит от ФС 2. ХЛ, ассоциированный в ФС 1, в силу более высокого, чем в ФС 2 фотохимического тушения возбужденных состояний, имеет очень низкий квантовый выход флуоресценции при физиологических температурах. При температуре жидкого азота квантовые выходы ХЛ ФС1 и ФС2 практически уравниваются.

В условиях, когда РЦ ФС2 - P680 находится в восстановленной форме, а первичный акцептор феофитин (ФФ) и хинонный акцептор Qa – окислен, то после возбуждения P680* полностью открыт путь для переноса электрона на Qa. Такое состояние, называется «открытым» РЦ. Высокая эффективность разделения зарядов в РЦ ФС2 приводит к тому, что флуоресценция ФС2 характеризуется квантовым выходом около 1,5% и временем жизни возбужденного состояния порядка $2 \cdot 10^{-10}$ с.

После переноса возбужденного электрона возникает комплекс $Z^+P680^+\Phi\Phi Qa^-$. Вслед за тем с высокой скоростью (порядка 10^{-9} с) происходит восстановление $P680$ электронами, получаемыми от системы разложения воды: $Z^+P680^+\Phi\Phi Qa^-$. При этом акцептор электрона Qa^- на времена порядка 10^{-4} с остается в восстановленном состоянии и не способен принять еще один электрон от новых разделенных зарядов. Такое состояние РЦ называется «закрытым», поскольку энергия следующего кванта света, приводящая в возбужденное состояние $P680^*$, не может быть использована для разделения зарядов до тех пор, пока не произойдет окисления акцептора Qa^- . В этом случае энергия разделенных зарядов ($P680^+\Phi\Phi$) в результате рекомбинации переходит в энергию возбужденного состояния ХЛ и может быть растрочена в виде флуоресценции:



Эта флуоресценция имеет рекомбинационную природу и время жизни возбужденного состояния порядка $2 \cdot 10^{-9}$ с.

Свет очень низкой интенсивности не вызывает «закрытия» РЦ и возбуждает флуоресценцию ХЛ, интенсивность которой принято называть F_0 . При высоких интенсивностях света происходит полное насыщение процессов фотосинтеза, когда фотохимическое разделение зарядов становится невозможным. Такое состояние соответствует полностью «закрытым» РЦ и значению интенсивности флуоресценции ХЛ – F_m , которое обусловлено сложением флуоресценции F_0 и рекомбинационной флуоресценции. Квантовый выход флуоресценции при «закрытых» РЦ в несколько раз выше, чем в условиях, когда РЦ «открыты». Разность максимального и минимального значений выходов флуоресценции пропорциональна той части энергии света, которая используется в фотохимических реакциях фотосинтеза в условиях открытых РЦ ФС2. Отношение $(F_m - F_0)/F_m$ (относительная переменная флуоресценция) равна потенциально возможной эффективности использования энергии света РЦ ФС2 и является безразмерной величиной, способной приобретать значения от 0 до 0,84 в зависимости от состояния ФСА растительного объекта. Величина относительной переменной флуоресценции может быть определена для любых растительных организмов и не зависит от содержания ХЛ в исследуемой пробе

Воздействие света высокой интенсивности на растительный организм, адаптированный к темноте, вызывает изменения интенсивности флуоресценции ХЛ а во времени (кривая индукции Каутского) (рис. 40). Эта кривая имеет несколько фаз. Она начинается от значения интенсивности флуоресценции, соответствующей квантовому выходу флуоресценции при открытых реакционных центрах ФС 2 (F_0), достигает максимальной интенсивности флуоресценции F_m при полном «закрытии» РЦ за время меньше 1 с и завершается снижением выхода флуоресценции. Последняя фаза может быть обусловлена двумя процессами: а) увеличением фотохимического тушения при ускорении транспорта электронов и соответствующим уменьшением степени восстановления хинонных акцепторов ФС2, приводящим к открытию части РЦ; б) повышением вероятности тепловой инактивации возбужденных молекул ХЛ (нефотохимическим тушением). Нефотохимическое тушение обусловлено, главным образом, регуляторными процессами на фотосинтетической мембране и направлено на защиту ФСА от окислительного повреждения при избыточном облучении объекта.

Длительное облучение объекта постоянно действующим светом переводит часть РЦ в «закрытое» состояние и создает условия для развития нефотохимического тушения возбужденных состояний ХЛ. При измерениях флуоресценции, не вызывающих изменений состояния ФСА, в условиях постоянно действующего на объект света регистрируется значение выхода флуоресценции F_t . Воздействие на объект насыщающей вспышки света приводит к полному «закрытию» РЦ, когда интенсивность флуоресценции приобретает значение F'_m . Оно меньше, чем в условиях предварительной адаптации в темноте (F_m). Так как в обоих состояниях акцепторы ФС2 восстановлены и, следовательно, фотохимическое тушение отсутствует, разница между F_m и F'_m характеризует величину нефотохимического тушения (qN). Разница между значениями F'_m и F_t характеризует величину фотохимического тушения (qP') при заданном освещении. На рис. 41 представлена диаграмма изменений во времени возбуждающего флуоресценцию света и соответствующие интенсивности стационарной флуоресценции ХЛ. В настоящее время общепринятым является вычисление показателей состояния ФСА на основании измерений интенсивностей стационарной флуоресценции ХЛ по следующим формулам:

- потенциальная эффективность ФС2 $(F_m - F_0)/F_m$;
- эффективность ФС2 в заданных условиях освещения $(F'_m - F_t)/F'_m$;
- фотохимическое тушение: $qP = (F_m - F_t)/(F'_m - F_0)$;
- нефотохимическое тушение: $qN = (F_m - F'_m)/(F_m - F_0)$;
- коэффициента нефотохимического тушения $NPQ = F_m/F'_m - 1$.

Измерение эффективности $(F'_m - F_t)/F'_m$ при заданной интенсивности постоянного света определенной длины волны позволяет определить скорость фотосинтетического электронного транспорта растительных объектах на уровне ФС2. Электронный транспорт (ETR'), создаваемый одним реакционным центром ФС2:

$$ETR' = \sigma_{\lambda PSII} \cdot I_{\lambda} \cdot \frac{F'_m - F_t}{F'_m}, \text{ где}$$

I_{λ} – интенсивность постоянного света [квантов·м⁻²·с⁻¹] с длиной волны λ ,

$\sigma_{\lambda PSI}$ – эффективное сечение поглощения ФСЕ ФС2 на длине волны λ возбуждающего флуоресценцию света. Электронный транспорт (ETR) для растительного объекта от всех РЦ ФС2 равен:

$$ETR = k \cdot \frac{F'_m - F'_t}{F'_m} \cdot \int D(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot d\lambda, \text{ где}$$

k – коэффициент пропорциональности, зависящий от соотношения количества комплексов ФС 2 и спектра поглощения объекта;

$D(\lambda)$ – спектр поглощения объекта;

$I(\lambda)$ – спектр падающего на объект света;

$\int D(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot d\lambda$ – количество поглощенных объектом квантов света в области ФАР.

Величина ETR пропорциональна выделению кислорода объектом за счет фотосинтеза. Это справедливо, если кислород, полученный при разложении воды, не вступает в какие-либо реакции, например, при восстановлении кислорода в псевдоциклическом транспорте электронов. Таким образом, величина ETR может быть использована для определения первичной продукции данного объекта в естественной среде обитания.

Флуоресценция ХЛ дает возможность определять не только перечисленные выше показатели состояния ФСА. Для получения более полной информации о функциональном состоянии ФСА можно проанализировать кинетические параметры кривой индукции флуоресценции ХЛ. Анализ кривой индукции флуоресценции ХЛ посвящено большое количество экспериментальных и теоретических работ. Типичная кривая индукции флуоресценции ХЛ ($F(t)$) представлена на рис. 40. Во временном отрезке от F_o до F_m кривая индукции флуоресценции ХЛ монотонно возрастает и включает в себя четыре характерных точки, обозначаемых O , J , I и P . Этот участок кривой индукции флуоресценции ХЛ можно разделить на первую, быструю фотохимическую $O - J$ и более медленную, терминальную $J - I - P$ фазы.

Наращение интенсивности по ходу кривой индукции флуоресценции ХЛ после включения света определяется повышением доли «закрытых» РЦ. Если x – доля «закрытых» РЦ ФС 2, то квантовый выход флуоресценции в любой момент времени от начала освещения объекта:

$$\eta(t) = \frac{k_f}{k_f + k_d + k_p(1-x)}$$

Для данного объекта отношение квантовых выходов флуоресценции равны отношению соответствующих интенсивностей флуоресценции, измеренных в равных условиях, например, $\frac{\eta_m - \eta_0}{\eta_m} = \frac{F_m - F_o}{F_m}$. На этом

основании можно вычислить долю «закрытых» РЦ ФС 2 к моменту времени t по данным, полученным в эксперименте:

$$X_{\text{эксн}}(t) = \frac{F_{\text{эксн}}(t) - F_o}{F_{\text{эксн}}(t)} \cdot \frac{F_m}{F_m - F_o}.$$

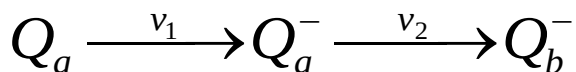
Одним из возможных подходов к анализу кривой индукции флуоресценции ХЛ заключается в том, что функцию $X_{\text{эксн}}(t)$ можно аппроксимировать суммой 3-х экспоненциальных компонент:

$$X(t) = 1 - \left(A_1 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_1}} + A_2 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_2}} + A_3 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_3}} \right),$$

причем $A_1 + A_2 + A_3 = 1$ и $0 < \tau_1 < \tau_2 < \tau_3$. Каждая из этих компонент характеризуется вкладом в кинетику перехода РЦ в закрытое состояние – A_i и постоянной времени τ_i . Предэкспоненциальный множитель показывает вклад соответствующей экспоненты в переменную флуоресценцию, а постоянная времени обратно пропорциональна константе скорости, т. е. чем больше постоянная скорости, тем меньше скорость реакции.

Кинетика перехода РЦ в закрытое состояние $X_{\text{эксн}}(t)$ описывается функцией $X(t)$ с удовлетворительной точностью. Время составляет десятки микросекунд, τ_2 больше, чем τ_1 в 50-500 раз и соответствует единицам миллисекунд, а время τ_3 равно 100-200 мс. Таким образом, экспоненциальные составляющие функции $X_{\text{эксн}}(t)$ не перекрываются по времени. На этом основании Штрассер и Лазар связали их с определенными процессами, последовательно протекающим внутри комплекса ФС2 и в его ближайшем окружении.

Фотохимическую фазу кривой индукции (фазу OJ) характеризуют два экспериментально определяемых параметра: A_1 – доля РЦ, закрытых на фазе OJ (рис. 42), и τ_1 – время, за которое функция $X(t)$ достигает уровня $(1 - 1/e) \cdot A_1 = 0,63 \cdot A_1$. Зависимости A_1 и τ_1 от интенсивности возбуждающего света можно описать схемой, включающей фотохимический перенос электрона к первичному хинону Q_a со скоростью v_1 и реакцию окисления Q_a^- со скоростью v_2 для восстановления вторичного хинона Q_b :



В такой схеме процесс переноса двух электронов на Q_b для простоты описывается обобщенной константой k_2 . Хотя известно, что для первого и второго электронов, переносимых на Q_b , константы скоростей различны. В данной схеме также не учтены возможные реакции обратного переноса электронов. Однако такое описание дает возможность определить ряд параметров, характеризующих функциональное состояние ФСА: если $[Q_a] + [Q_a^-] = 1$, то $v_2 = k_2 \cdot [Q_a^-]$, $v_1 = k_1 \cdot (1 - [Q_a^-]) = I_0 \cdot \sigma_{PSII} \cdot \varphi \cdot (1 - [Q_a^-])$.

Константа фотохимической реакции, k_1 , равна скорости разделения зарядов v_1 при полностью открытых РЦ и равна произведению плотности потока квантов (I_0) на среднее эффективное сечение поглощения пигментов одного РЦ (σ_{PSII}) и на вероятность разделения зарядов в открытом РЦ ФС2 $\varphi = F_v/F_m$:

$$k_1 = I_0 \cdot \sigma_{PSII} \cdot \varphi.$$

Выход кривых $F_{\text{эксп}}(t)$ и $X_{\text{эксп}}(t)$ на “плато” J соответствует моменту установления квазистационарного состояния РЦ, при котором приток электронов на Q_a уравнивается их оттоком на Q_b . Из условия стационарного состояния ($v_1 = v_2$) следует, что на пике J доля восстановленного Q_a определяется соотношением между константой фотохимического разделения зарядов ($I_0 \cdot \sigma_{PSII} \cdot \varphi$) и константой переноса электрона на Q_b (k_2):

$$[Q_a^-]_J = \frac{I_0 \cdot \sigma_{PSII} \cdot \varphi}{I_0 \cdot \sigma_{PSII} \cdot \varphi + k_2}$$

При постоянных для объекта величинах k_2 , σ_{PSII} и φ , график $[Q_a^-]_J$ от I_0 представляет собой монотонно возрастающую кривую с насыщением. Экспериментальная зависимость A_1 от I_0 имеет именно такой характер (рис. 43). Теоретически, величина $[Q_a^-]_J$ достигает половины уровня насыщения при $I_0 \cdot \sigma_{PSII} \cdot \varphi = k_2$.

При интенсивностях возбуждающего света, превышающих 2000 мкмоль кв. м⁻²·с⁻¹, переход РЦ в закрытое состояние завершается быстрее, чем начинается восстановление Q_b . В этом случае доля «закрытых» РЦ $X(t)$ может быть описана уравнением:

$$\frac{dX}{1-X} = \varphi \cdot \sigma_{PSII} \cdot I_0 \cdot dt$$

$$X = 1 - e^{-\frac{t}{\tau}}, \text{ где } \frac{1}{\tau} = I_0 \cdot \sigma_{PSII} \cdot \varphi.$$

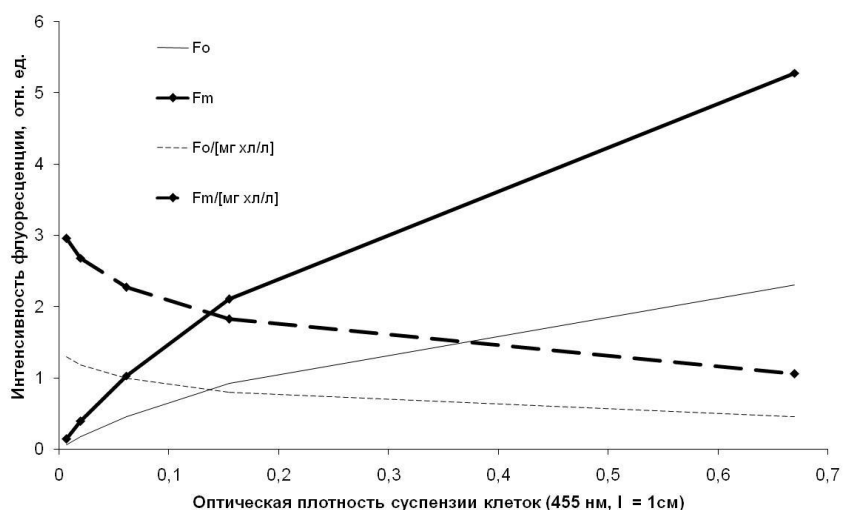
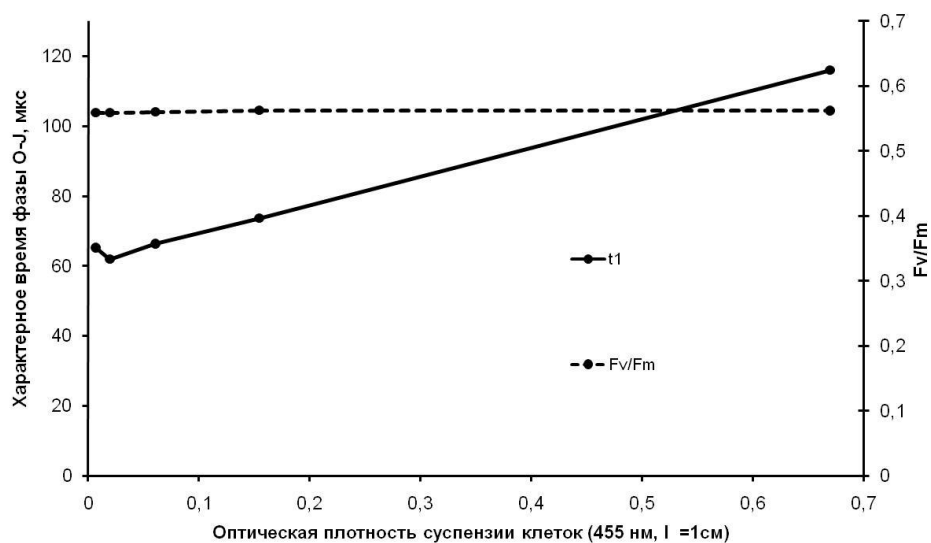
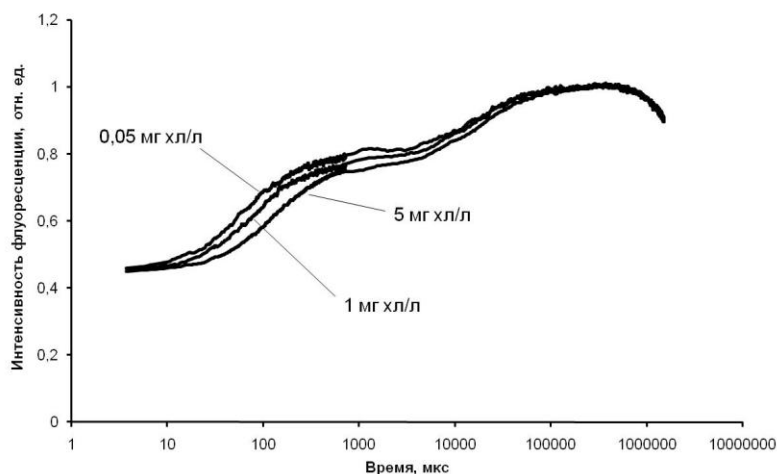
В рамках сделанных допущений, τ можно отождествить со временем нарастания функции $X(t)$ на фотохимической фазе индукции τ_1 . Величина $1/\tau_1$ линейно зависит от интенсивности возбуждающего света (рис. 44a). Тангенс угла наклона световой кривой $1/\tau_1$ (рис. 44б) равен с точностью до φ среднему эффективному сечению поглощения пигментов, приходящихся на один РЦ ФС2 (σ_{PSII}):

$$\sigma_{PSII} = \frac{1/\tau_1}{\varphi \cdot I_0}$$

Эффективное сечение поглощения пигментов, приходящихся на один РЦ, является чрезвычайно важной характеристикой условий, к которым адаптирован ФСА объекта. Адаптация к высоким интенсивностям света приводят к снижению эффективного сечения поглощения пигментов.

Следует отметить, что для корректного измерения кривых индукции флуоресценции, по которым можно определять эффективное сечение поглощения, необходимо обеспечить регистрацию флуоресценции при оптической плотности образца не более 0,05. Измерение флуоресценции образца с более высокой оптической плотностью не влияет на измеренное значение F_v/F_m , однако сопровождается удлинением фотохимической фазы кривой индукции. Данный эффект связан с экранированием возбуждающего света наружным слоем клеток в кювете и приводит к отклонению от линейной связи между параметрами F_0 и F_m и содержанием ХЛ в пробе.

Таким образом, измерение характеристик флуоресценции ХЛ позволяет определять состояния ФСА растительных объектов. Этот метод пригоден не только для лабораторных объектов, но может быть использован для определения состояния высших растений и фитопланктонных водорослей в природных условиях.



8.2. Длительное послесвечение ХЛ ФСА.

Фотосинтетические мембраны водорослей и высших растений в ответ на вспышку возбуждающего света излучают флуоресценцию, которая продолжается в течение длительного времени вплоть до десятков секунд. Это явление было открыто Стрелером и Арнольдом в 1951 году и названо длительным послесвечением (ДПС) или замедленной флуоресценцией. Последующие исследования показали, что спектр ДПС практически совпадает со спектром флуоресценции ХЛ. Энергия для возбуждения ДПС выделяется в

РЦ ФС2 в результате рекомбинации разделенных зарядов $P680^+$ и Q_a^- и затем переносится в антенный комплекс, из которого и происходит излучение флуоресценции. Квантовый выход ДПС чрезвычайно мал и обычно оценивается в 10^{-7} от поглощенного ФСА потока квантов.

После вспышки возбуждающего ФСА света ДПС монотонно затухает. Кривую затухания ДПС можно разложить на несколько экспоненциальных компонент с характеристическими временами жизни от наносекунд до минут. Это свидетельствует о многостадийности процессов, приводящих к излучению. Интенсивность ДПС в процессе затухания уменьшается на несколько порядков. При этом количество квантов света, излучаемых за время жизни каждого из компонентов в кривой затухания ДПС, сопоставимо по величине. Из чего следует, что в генерации света каждого из компонентов участвует сравнимое количество предшественников. Отдельные компоненты ДПС по-разному зависят от температуры и интенсивности возбуждающего света. Ингибиторы фотохимической активности хлоропластов также по-разному влияют на отдельные компоненты ДПС.

После поглощения кванта света в РЦ могут образоваться ряд заряженных переносчиков электронов как с акцепторной, так и с донорной стороны ФС2. Обратные реакции переноса зарядов и рекомбинация разнополярных зарядов приводит к ДПС с временами затухания, соответствующими временам жизни переносчиков электронов. Изучение кинетики затухания ДПС позволяет определить последовательность процессов стабилизации энергии возбуждения на переносчиках зарядов в ФС2.

Ингибирование реакций фотосинтеза диуроном ограничивает перенос электронов первичным хинонным акцептором Q_a^- . При этом доминирующим в затухании становится компонент с характеристическим временем около 1 мс. Интенсивность свечения данного компонента отражает восстановленность Q_a . Показано, что по зависимости от интенсивности возбуждающего света ДПС в присутствии диурана можно определить эффективное сечение поглощения антенного комплекса и количество РЦ ФС2 исследуемого объекта.

ДПС зависит не только от состояния акцепторной части ФС2, но и от окисленных переносчиков электронов, связанных с системой разложения воды. При освещении объекта серией коротких вспышек наблюдается осцилляция интенсивности ДПС с периодом кратным 4, что соответствует четырем состояниям кислород-выделяющей системы. Использование этих представлений позволяет оценить активность кислород-выделяющей системы в интактных клетках водорослей.

Одной из важнейших особенностей ДПС является зависимость ее интенсивности от величины градиента электрохимического потенциала на тилакоидной мембране. Такая зависимость обусловлена тем, что в силу строения ФС2 градиент электрохимического потенциала снижает энергию активации рекомбинации разделенных зарядов. Интенсивность ДПС можно описать уравнением:

$$I = k \cdot [P^+ A^-] \cdot \exp -[(E_A - \Delta\phi)/RT],$$

где I - интенсивность ДПС; k - константа, включающая квантовые выходы возбуждения и флуоресценции, а также константу взаимодействия разделенных зарядов; $[P^+ A^-]$ - концентрация РЦ с разделенными зарядами; E_A - энергия активации рекомбинации разделенных зарядов; $\Delta\phi$ - градиент электрохимического потенциала на мембране.

В исследованиях влияния градиента электрохимического потенциала на ДПС обычно используют измерение интенсивности на определенной фазе кривой затухания свечения. Для этих целей используется механические фосфороскопы. Работа фосфороскопа основана на том, что регистрация излучения образца производится через определенное время после прекращения действия возбуждающего света, который, также как и «быстрая» флуоресценция, не может попасть на приемник излучения. Фосфороскоп циклически через равные промежутки времени кратковременно возбуждает объект светом и в интервалах между облучением регистрирует излучение. При помощи фосфороскопа можно зарегистрировать кривую индукции ДПС. По параметрам кривой индукции ДПС можно определить величины градиентов электрического и протонного потенциалов на фотосинтетических мембранах.

Связь ДПС с величиной градиента электрохимического потенциала на мембране позволяет процессы энергизации тилакоидных мембран в растительных клетках при действии различных факторов среды. Эти процессы были исследованы на тилакоидах под действием гербицидов, токсинов, вирусных инфекций, при изменении минерального питания и в течение цикла развития культуры водорослей. На культурах водорослей при помощи ДПС были обнаружены изменения энергизации тилакоидных мембран хлоропластов в условиях инактивации нитрат-восстанавливающей системы и АТФ-азной активности.

По сравнению с «быстрой» флуоресценцией ХЛ ДПС мало применялось для изучения состояния природного фитопланктона. Тем не менее, в работах П.С.Венедиктова, Д.Н.Маторина, В.И.Звалинского и ряда других исследователей ДПС было использовано для оценки состояния природного фитопланктона. Следует отметить, что чрезвычайно плодотворным может быть совместное использование для исследования состояния ФСА природного фитопланктона методов «быстрой» флуоресценции и ДПС.

8.3. Термохемилюминесценция фитопланктонных организмов.

Интенсификация процессов ПОЛ мембран является универсальной реакцией растительных клеток на действие неблагоприятных условий среды. Для регистрации ПОЛ в растительных клетках используются разные методы: определение конъюгированных диенов ненасыщенных жирных кислот, малонового

диальдегида, шиффовых оснований и жирнокислотного состава липидов. Однако, определение конъюгированных диенов в растительных тканях, поглощающих в УФ-области спектра, значительно осложнено присутствием множества других соединений, поглощающих свет в той же области спектра. Широко применяемый метод определения малонового диальдегида по образованию окрашенного комплекса с тиобарбитуровой кислотой не имеет необходимой специфичности. Это обусловлено тем, что в растительных тканях могут присутствовать значительные концентрации фенолов, которые способны образовывать окрашенные комплексы с тиобарбитуровой кислотой. Накопления значительных количеств шиффовых оснований и изменения жирнокислотного состава липидов может быть обнаружено только на поздних стадиях окислительного повреждения растительных организмов.

Известно, что ПОЛ сопровождается хемилюминесценцией. Показано, что интенсивность такой хемилюминесценции пропорциональна квадрату концентрации перекисных радикалов (ROO^*)². Даже при низком квантовом выходе хемилюминесценции этот метод позволяет регистрировать начальные стадии ПОЛ. Для повышения чувствительности этого метода часто используют активаторы флуоресценции. Активаторы действуют по механизму миграции энергии. Они перехватывают на себя возбуждение продуктов рекомбинации радикалов и излучают люминесценцию с более высоким квантовым выходом. К активаторам хемилюминесценции наряду с антраценом, акридиновым оранжевым, эозином, ионами европия, производными кумарина и другими красителями относится и ХЛ.

Сонтанная хемилюминесценция описана только для непигментированных тканей высших растений. Она обусловлена генерацией АФК и является следствием не только ПОЛ, но и других процессов, в частности, внеклеточного окисления фенольных соединений. У зеленых растений и водорослей хемилюминесценция при физиологических температурах не обнаруживается. Однако при нагревании растительных объектов до 120-130 °С наблюдается хемилюминесценция, излучателем которой является ХЛ. П.С.Вненидиновым с сотрудниками было показано, что интенсивность высокотемпературной хемилюминесценции пропорциональна содержанию продуктов ПОЛ в листьях высших растений, культурах водорослей и изолированных хлоропластах. Механизм высокотемпературной хемилюминесценции окончательно не установлен, но наиболее вероятно, что при высокой температуре происходит распад перекисей липидов, накапливающихся в фотосинтетических мембранах. При распаде перекисей образуются свободные радикалы, рекомбинация которых приводит к образованию продуктов в возбужденном состоянии. Такие продукты передают возбуждение на ХЛ, люминесценция которого и наблюдается в эксперименте.

Высокая чувствительность метода высокотемпературной хемилюминесценции позволила проводить измерения содержания перекисей липидов в очень малом количестве биологического материала. Этот метод пригоден для проведения обследования состояния даже фитопланктона олиготрофных вод открытого океана.

В качестве примера ниже приведены исследования высокотемпературной хемилюминесценции фитопланктона природных вод. Для измерения высокотемпературной хемилюминесценции ХЛ пробу воды объемом 1 л, содержащую фитопланктон, осаждали на стекловолоконный фильтр GF/F Whatman. Относительное содержание ХЛ в осажденных на фильтр клетках можно определять по интенсивности флуоресценции ХЛ на длине волны 683 нм при возбуждении в области 440 нм. Измерение высокотемпературной хемилюминесценции водорослей на фильтрах проводили при помощи прибора, который обеспечивал надежную регистрацию сигнала от образца, содержащего до 10^{-11} г ХЛ. Исследования состояния фитопланктона в Черном море показали, что в дневные часы при высокой инсоляции в поверхностных водах может происходить накопление значительного количества перекисей липидов. На рис. 45 показаны изменения параметров флуоресценции ХЛ и интенсивности термолуминесценции проб фитопланктона под действием повышенных интенсивностей света. В начальный период (1-20 мин) интенсивного облучения падает фотосинтетическая эффективность (F_v/F_m) в ответ на действие света. На этом этапе изменения состояния фотосинтетического аппарата имеют обратимый характер. Однако при дальнейшем облучении (после 20 мин) в мембранных структурах хлоропластов водорослей происходит накопление продуктов перекисного окисления липидов, что приводит к росту термохемилюминесценции. По данным, полученным на культурах, именно в этот период и происходит гибель клеток.

В комплексной биологической экспедиции на НИС «Витязь» в Черном море и Атлантическом океане в 1991 г. В Черном море уровень ТХЛ фитопланктона, нормированный на концентрацию ХЛ был выше на глубинах с низким содержанием пигментов на единицу объема воды. Аналогичные изменения высокотемпературной хемилюминесценции наблюдали и для мезотрофных вод северо-западной Атлантики. В среднем, уровень высокотемпературной хемилюминесценции в пробах микрофитопланктона был в 2-10 раз выше, чем в пробах нанофитопланктона. Для большинства исследованных районов Атлантического океана характерно экспоненциальное снижение интенсивности высокотемпературной хемилюминесценции с увеличением глубины, которое совпадало с изменением дозы поглощенной ФАР. Низкий уровень высокотемпературной хемилюминесценции соответствовал пробам воды с горизонтов, где условия наиболее благоприятны для нормального развития водорослей. В теплых водах наблюдается более высокий уровень высокотемпературной хемилюминесценции, чем в холодных. Интенсивность высокотемпературной хемилюминесценции, как правило, оказывалась выше в образцах микрофитопланктона с относительно более высоким содержанием фикобилинов.

На рис. 46 представлены обобщенные данные о связи интенсивности высокотемпературной хемилюминесценции с подводной облученностью и температурой на станциях субширотного разреза Атлантического океана. Зависимости высокотемпературной хемилюминесценции от дозы ФАР, получаемой фитопланктоном, имеет тенденцию снижения высокотемпературной хемилюминесценции при малых интенсивностях света и низкой температуре. В подавляющем большинстве наших измерений интенсивность высокотемпературной хемилюминесценции с глубиной зеркально соответствовала содержанию ХЛ. Из этого следует, что в благоприятных для развития фитопланктонного сообщества условиях процессы окислительного повреждения ФСА протекают на очень низком уровне. Высокий же уровень ТХЛ является показателем значительного окислительного повреждения ФСА фитопланктона и, соответственно, малой заселенностью горизонта. Исключения могут быть связаны с быстро меняющимися условиями среды, когда ответная реакция организмов не успевает реализоваться в численности клеток фитопланктона.

8.4. Изменение функциональных характеристик фотосинтетического аппарата *Th. w.* в процессе роста клеток в накопительной культуре.

Общая характеристика роста клеток *Th. w.* и изменений их пигментного аппарата в накопительной культуре. На рис. 9 представлены кривые роста культур, построенные по количеству клеток, по содержанию хлорофилла в объеме суспензии и по оптической плотности культуры в максимуме поглощения хлорофилла *a*.

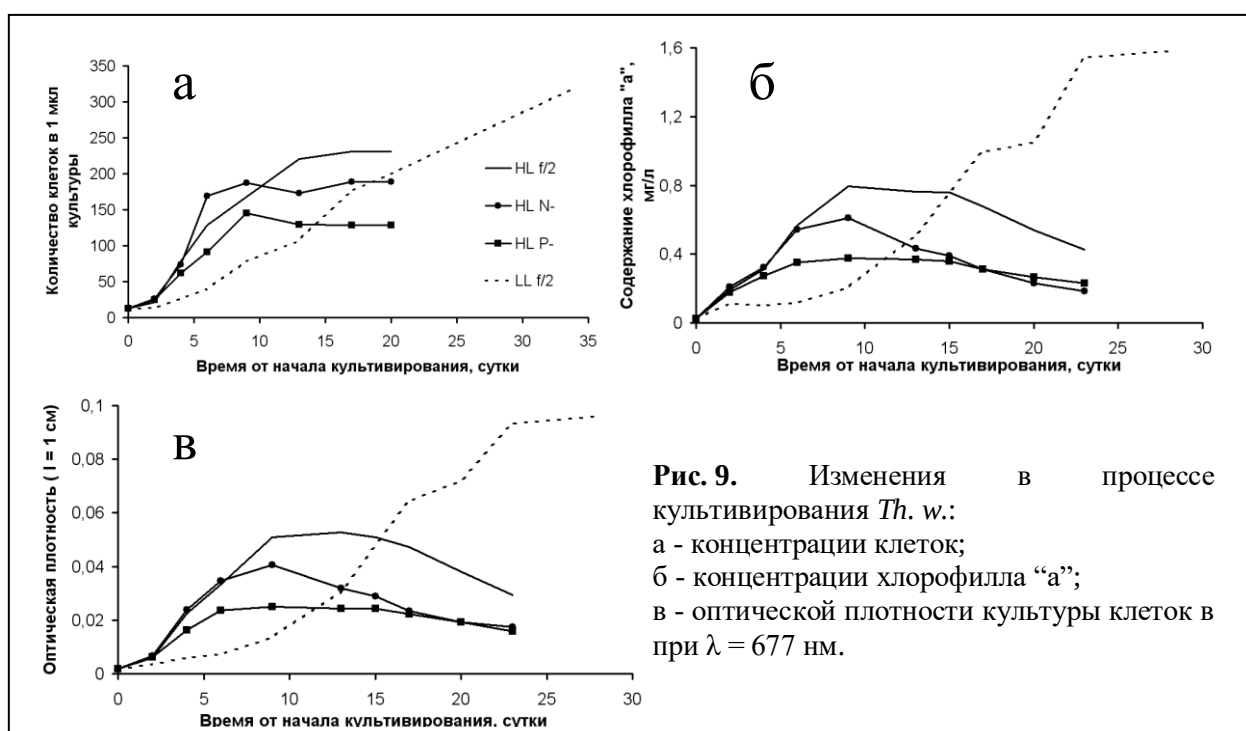
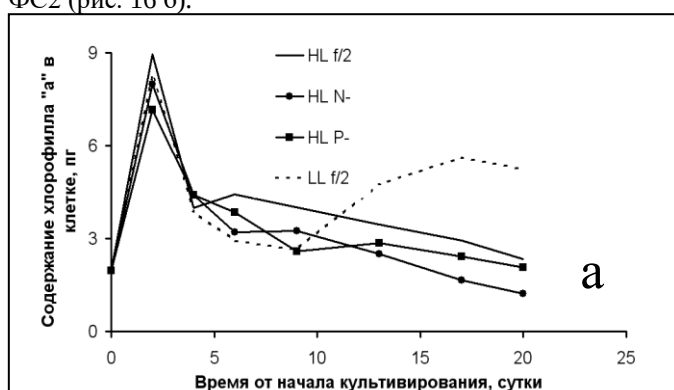


Рис. 9. Изменения в процессе культивирования *Th. w.*:
а - концентрации клеток;
б - концентрации хлорофилла "а";
в - оптической плотности культуры клеток в при $\lambda = 677$ нм.

количеством падающего света в случае адекватного обеспечения элементами минерального питания. Однако, по мере истощения азота и фосфора в среде и в самих клетках, деление водорослей прекращается. Нетривиальным является тот факт, что при одинаковом исходном содержании биогенных элементов максимальное количество клеток и пигментов в культуре HL оказывается в 1,5 - 2 раза ниже, чем в культуре LL (полная среда, HL f/2 и LL f/2, рис. 9 б). Вероятным его объяснением является вынужденный расход части минеральных ресурсов на защиту клеток от повреждающего светового воздействия, проявляющегося после 6-го дня культивирования по снижению F_v/F_m (рис. 13 в) и по уменьшению количества активных РЦ ФС2 (рис. 16 б).



В первые 2 дня во всех культурах скорость синтеза хлорофилла превышает темпы деления клеток, поэтому содержание хлорофилла в клетке увеличивается с 2 пг до 8-9 пг (рис. 10 а). К 4-м суткам образование хлорофилла в клетках замедляется, в то время как частота деления клеток сохраняется

практически на том же уровне. К моменту прекращения деления клеток в культуре (13-й день для HL и 35-й день для LL, рис. 9 а), среднее внутриклеточное содержание хлорофилла в культуре LL составляет – 5 пг, а в культурах HL – 3,5 пг (рис. 10 а).

Соотнесение оптической плотности суспензии клеток (677 нм) к оптической плотности ацетонового экстракта (664 нм) позволяет оценить в разные моменты времени влияние на поглощение света плотной упаковки молекул хлорофилла в хлоропластах и клетках. Видно, что поглощение хлорофилла в составе интактных клеток на протяжении всего эксперимента остается ниже поглощения, которое дает то же количество хлорофилла в растворе ($OD_{\text{сусп}}/OD_{\text{экстр}}$ меньше 1, рис. 10 б). Более чем трехкратный “скачок” внутриклеточного содержания хлорофилла (рис. 10 а, 2-е сутки) сопровождается скачкообразным уменьшением вдвое эффективного сечения поглощения молекулы хлорофилла в клетке (рис. 10 б, 2-е сутки). Возможно, значительный эффект упаковки обусловлен увеличением локальной концентрации хлорофилла в пределах отдельного хлоропласта. В последствии, хлоропласты начинают делиться, в результате чего плотность упаковки уменьшается (дни 2-10, рис. 10 б).

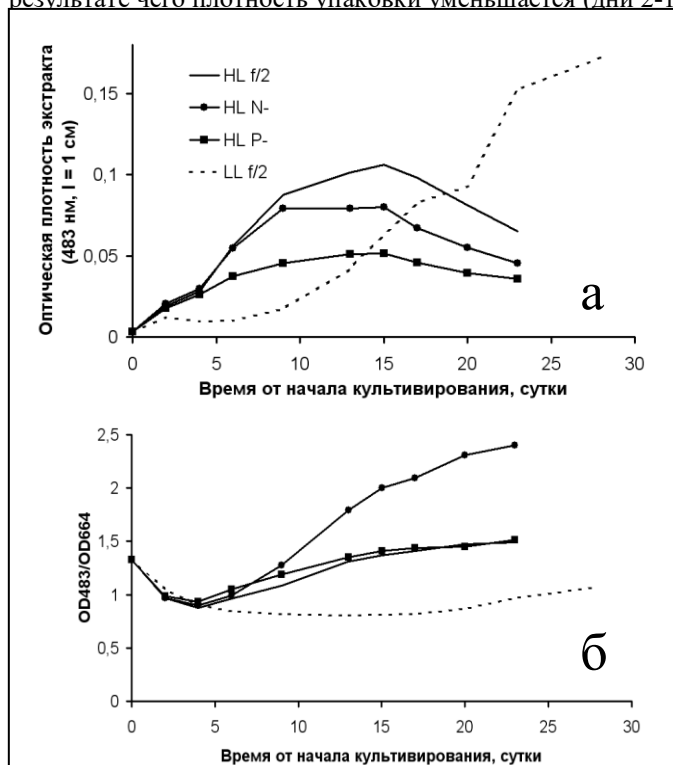
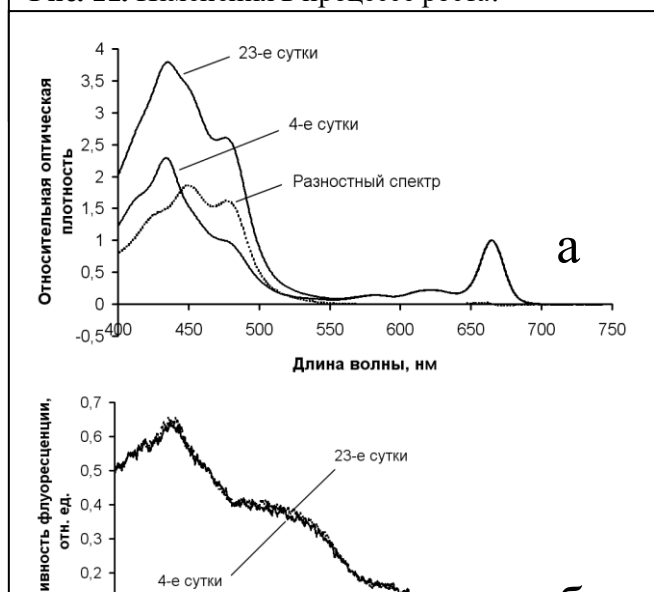


Рис. 11. Изменения в процессе роста:

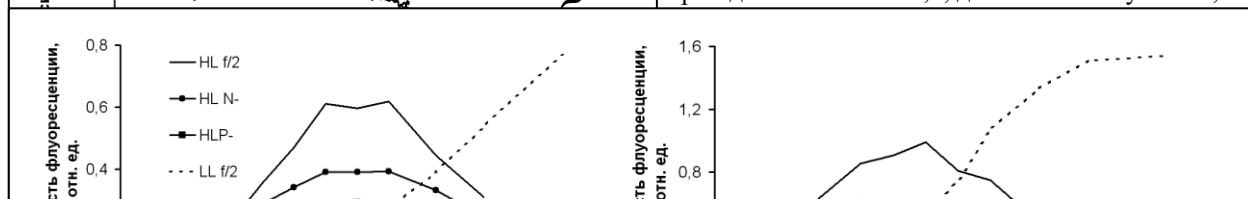


Наряду с непрерывным изменением в культурах клеток общего содержания хлорофилла (рис. 9 б), по ходу культивирования изменяется также и общее содержание каротиноидов (рис. 11 а). Количество каротиноидов в клетке по отношению количеству хлорофилла (рис. 11 б) не является постоянной величиной и коррелирует по времени с функциональным состоянием ФС2 (рис. 13 в). После пересадки на свежую среду, в течение первых 4-5 дней относительное количество каротиноидов по сравнению содержанием хлорофилла падает (рис. 11 б). Так как общее содержание (рис. 11 а), уменьшение параметра OD_{483}/OD_{664}

фаза экспоненциального роста клеток длится не характеризуется минимальным соотношением относительной переменной флуоресценции культуры LL оказывается гораздо более длительной и пропорциональным синтезом хлорофилла и прекращается раньше, чем останавливается синтез каротиноидов в культуре и в отдельно взятой хлорофилла уже начало убывать. На еще более кания как хлорофилла, так и каротиноидов.

Спектры поглощения пигментов в экстракте в моменты максимального и минимального соотношения каротиноиды/хлорофилл (N- день 4 и день 23, рис. 11 б) значительно отличаются в области поглощения каротиноидов (400-500 нм, разностный спектр на рис. 12 а). В то же время, спектры возбуждения флуоресценции хлорофилла в клетках в моменты максимального и минимального соотношения каротиноиды/хлорофилл практически не отличаются друг от друга (рис. 12 б). Это говорит о том, что каротиноиды, сохраняющиеся в клетках *Th. w.* при голодании, не выполняют светособирающей функции.

Ниже приведены графики изменения F_0 (рис. 13 а), F_m и хлорофилла (рис. 13 в), измеренные в культурах сопровождается увеличением F_0 и F_m . Относительная пересадки составляло 0,1, достигает к 4 суткам 0,75.



Во всех культурах, инкубированных при плотности потока квантов $40 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, происходит более быстрое восстановление фотосинтетической активности, чем в культуре, инкубированной при плотности потока квантов $5 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (1-е сутки, рис 13 в).

Для культур HL короткая фаза экспоненциального роста (2-6 день) характеризуется высоким значениям F_v/F_m . После 6-го дня наблюдается спад F_v/F_m и замедление роста F_m . При достижении значения $F_v/F_m = 0,5$ (9 - 11 сутки) рост F_m прекращается (рис. 13 б). Культура LL, не смотря на сохраняющийся длительное время высокий уровень F_v/F_m (2-20 день, рис. 13 в), в течение первых двух недель уступает по накопленному количеству пигментов (F_m) культуре HL f/2. При высокой эффективности первичных процессов фотосинтеза рост культуры LL лимитирован низкой интенсивностью падающего света.

Синтез хлорофилла в культуре обуславливает увеличение параметров F_0 и F_m в процессе роста. Чтобы определить в таких условиях интенсивность фото- и нефотохимического тушения, параметры F_0 и F_m были нормированы на величину поглощения света хлорофиллом в суспензии (рис. 14). После пересадки культуры происходит снижение удельной величины F_0 в 2-2,5 раза (рис. 14 а). Удельное значение F_m увеличивается на 20-30% (рис. 14 б). В фазе голодания, сопровождающейся снижением F_v/F_m , удельные величины F_0 и F_m возвращаются к исходным значениям.

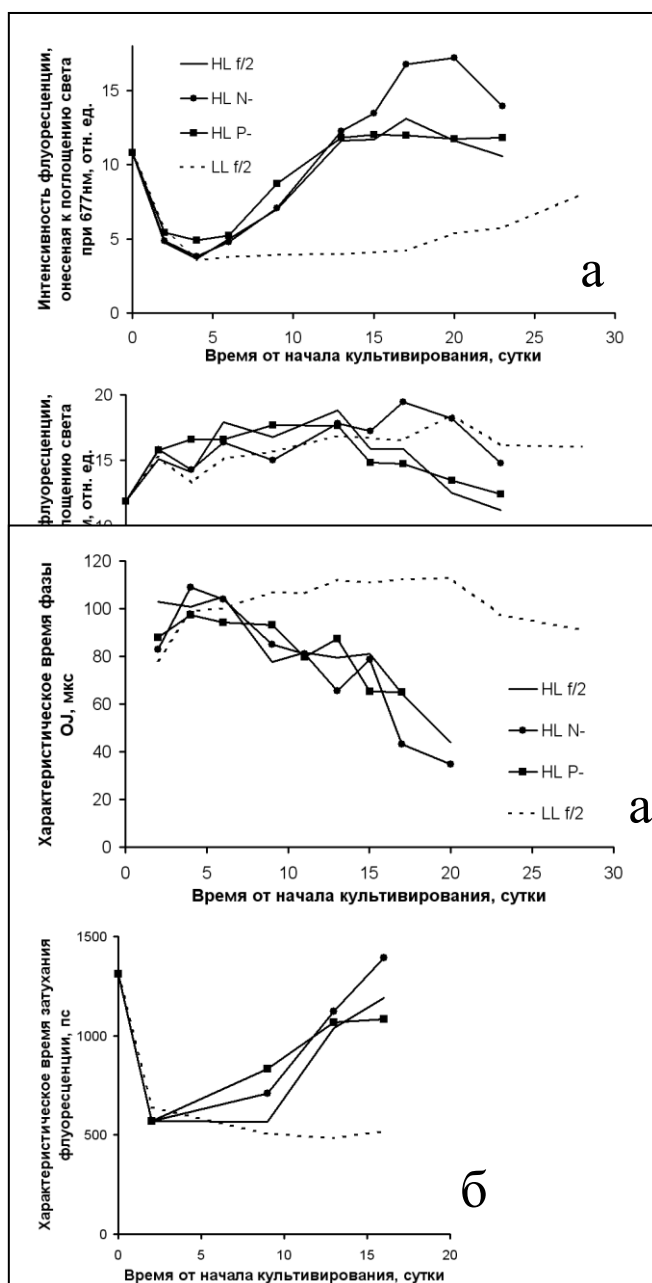
рис. 14 а) говорит о возрастании интенсивности

индукционные кривые флуоресценции после 5-ти стическое время фотохимической фазы τ_1 (см. главу 5) неопределенным, так как разница между F_0 и F_m поровнятия эффект индукции флуоресценции и фаза ОЖ начала – увеличением времени фотохимической фазы ем этого времени вдвое (культуры HL на 15-е сутки, нается к концу эксперимента (25 - 30 день) и к 0%.

По интенсивности падающего света и характеристическому времени фотохимической фазы было определено сечение поглощения антенного комплекса, приходящегося на один РЦ. В 4-й день для всех культур оно составило $670 \text{ \AA}^2$. На этапе голодания время фотохимической фазы сокращается (рис. 15 а). Предположить то, что в клетках при этом происходит наращивание размера светособирающей антенны, трудно, учитывая тот факт, что общее количество хлорофилла убывает (рис. 13 б). Вероятно, ускоренный переход РЦ в закрытое состояние при

Ц в фотосинтетических единицах, из-за чего картина была получена ранее, когда часть РЦ $40 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, рис. 12).

ания флуоресценции во время культивирования длительность составляла 1300 пс. Минимальное ствует минимуму значения удельного F_0 и



максимальному уровню F_v/F_m . На поздних стадиях роста (после 6-го дня в рис. 13 в), длительность быстрой компоненты возрастает до 1300 пс (рис. 15 б).

Для оценки общего количества активных РЦ ФС2 в суспензии клеток была измерена интенсивность 3Ф хлорофилла. Культивирование водорослей сопровождается увеличением числа активных центров на стадии экспоненциального роста и его быстрым уменьшением при голодании (рис. 16 а). Количество активных РЦ в пересчете на поглощение хлорофилла в суспензии клеток (рис. 16 б) достигает максимального значения на 4-6 день культивирования, а затем снижается. Уменьшение удельного количества РЦ происходит за счет многократного уменьшения общего количества активных РЦ в

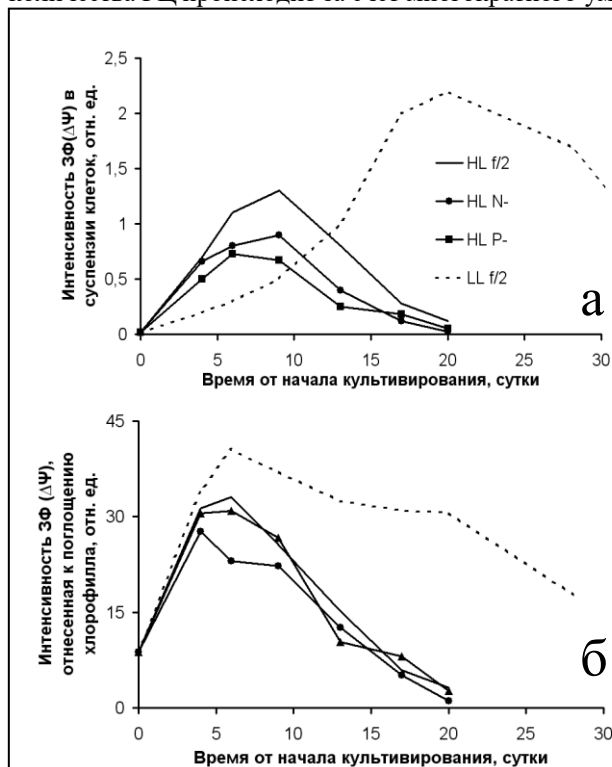


Рис. 16. Изменение количества активных РЦ:
а – в единице объема культуры;
б – по отношению к поглощению хлорофилла.

значимым фактором, определяющим величину квантового выхода флуоресценции ХЛ, является соотношение количества пигментов, ассоциированных в фотосистемах. Преобладание пигментов в ФС1 приводит к снижению квантового выхода флуоресценции ХЛ, так как эффективность тушения возбужденных состояний в ФС1 многократно превосходит этот процесс в ФС2. В связи с этим многие цианобактерии имеют квантовый выход флуоресценции в 5-10 раз меньший, чем у зеленых, диатомовых и пиридиниевых водорослей. На рис. 48 приведены значения относительного квантового выхода флуоресценции ХЛ различных групп водорослей и цианобактерий. Как видно, квантовые выходы их флуоресценции отличаются в несколько раз. Тем не менее, корректные измерения по интенсивности флуоресценции ХЛ обилия фитопланктона в природных водах возможно. Необходимыми условием для этого является постоянство или малые изменения состав фитопланктонного сообщества в обследуемой акватории и получение зависимости интенсивности флуоресценции ХЛ от содержания пигментов, определенных экстракционным методом в пробах воды. Полученная калибровочная кривая позволяет установить обилие фитопланктона на выбранной акватории в определенный сезон. При смене гидрологических условий необходимо проводить новую калибровку. Пример калибровочной кривой представлен на рис. 49.

На основании калибровочной кривой по величине F_0 может быть определено обилие фитопланктона на любом из описанных ниже приборов. Флуоресцентная методика позволяет получать очень большие объемы информации при минимальных затратах времени в случаях проведения зондирования водной толщи и для определения распределения фитопланктона на локальных полигонах.

В качестве примера использования флуоресцентных методов для определения состояния ФСА фитопланктона природных вод далее будут приведены результаты обследования ряда акваторий Черного моря. В Черном море в летнее время наибольшие содержания фитопланктона, как правило, приурочены к зоне шельфа и водам Основного Черноморского Течения, проходящего вдоль берегов Кавказа с юго-востока на северо-запад. Высокое содержание фитопланктона в этих районах находится в относительно теплом поверхностном перемешанном слое, толщина которого может достигать 40 м. Типичное вертикальное распределение фитопланктона, определенное по интенсивности флуоресценции ХЛ (F_0), представлено на рис. 50. Эффективность фотосинтеза фитопланктона, определенная по значениям переменной

культуре (рис. 16 а) при слабо меняющемся общем содержании хлорофилла (рис. 13 б). Такая же картина была получена Чемирисом на зеленой водоросли *Chlorella*. В случае с хлореллой, причиной снижения фотохимического тушения в ФСЕ и роста удельной величины F_0 является хлородоыхание, которое обеспечивает восстановление пула пластохинонов и хинонов, входящих в состав ФС2, в темноте. Можно предположить, что при голодании *Th. w.* активируются аналогичные процессы регуляции, в результате которых интенсивность фотохимического тушения уменьшается.

ного фитопланктона по параметрам

о микроводорослей при постоянной интенсивности ржанию всех пигментов, участвующих в передаче ри постоянстве соотношения фотосинтетических сценции пропорциональна содержанию ХЛ а (рис. я для любых суспензий водорослей, оптическая превосходит 0,05.

пигментов и флуоресценцией ХЛ были созданы опланктона по интенсивности флуоресценции ХЛ. о квантовый выход флуоресценции ХЛ зависит от ей, а также от условий их выращивания. Наиболее

флуоресценции, приведена на [рис. 51](#). Из сопоставления этих данных следует, что максимальное содержание пигментов соответствует максимальной эффективности фотосинтеза на данной глубине.

В прибрежных водах в летние периоды высокая фотосинтетическая активность, определенная по переменной флуоресценции (F_v/F_m), как правило, соответствует максимуму обилия фитопланктона. Это характерно для квазистационарных условий существования популяции фитопланктона (минеральное питание, световой режим и др.). Фотосинтетическая активность определяет скорость роста водорослей и продукционные параметры фитопланктона. Ранее на культурах микроводорослей было показано уменьшение скорости роста клеток при ингибировании активности первичных реакций фотосинтеза, регистрируемой по переменной флуоресценции F_v/F_m неблагоприятными условиями или токсикантами. Зависимость между активностью фотосинтеза и количеством фитопланктона часто обнаруживалась и при измерении черноморского фитопланктона в стационарных гидрологических условиях ([рис. 52](#)). Вместе с тем при быстром изменении условий среды возможно несоответствие эффективности фотосинтеза величине биомассы водорослей. Эта ситуация типична для начальной фазы сукцессии фитоценоза и наблюдалась нами в холодных водах на периферии дивергентной зоны. Для терминальной стадии сукцессии характерна низкая эффективность фотосинтеза при высоких значениях биомассы фитопланктона, что соответствует условиям угнетения роста водорослей.

Выяснение состояния фитопланктонного сообщества больших акаторий невозможно без информации о распределении вод по обилию водорослей и их фотосинтетической активности. Особенно важно получать такие данные по ходу судна с целью обнаружения градиентных зон и выбора станций для проведения детальных обследований фитопланктона. Для измерения распределения и фотосинтетической активности природных популяций фитопланктона по акватории может быть использован проточный флуорометр, позволяющий измерять параметры флуоресценции ХЛ F_0 и эффективность фотосинтеза (F_v/F_m) фитопланктона в верхнем слое воды по ходу судна в режиме реального времени. На [рис. 53](#) представлен протокол измерения параметров флуоресценции, полученные 24 июня 2004 г. в 62 рейсе НИС «Акванавт». В этот день при переменной облачности временами шел дождь. В связи с этим эффективность фотосинтеза на данном разрезе была значительно выше, чем в солнечные дни, так как при высокой инсоляции эффективность фотосинтеза снижается. Такие условия практически не вызывали изменений показателя обилия фитопланктона F_0 под действием света. Данный разрез представлен 840 дискретными измерениями, каждое из которых было получено путем усреднения более 100 значений показаний флуорометра. Такие измерения позволяют с высокой достоверностью определить пространственную неоднородность распределения и фотосинтетической активности фитопланктона поверхностных вод.

За период наших летних наблюдений 1998 - 2004 годов распределение фитопланктона в основном сохраняло описанную выше структуру. В ряде случаев были обнаружены два максимума, один из которых, как правило, находился в области термоклина (максимального градиента температуры), а второй – ниже термоклина. Принципиальное единообразие распределения обилия фитопланктона может испытывать изменения в различные годы. Сопоставление результатов зондирования в 2000 и 2002 гг. показало ([рис. 54](#)), что экологическое состояние фитопланктона в северо-восточной части Черного моря в конце лета 2002 года претерпело существенное изменение. Во всем северо-восточном секторе моря, в отсутствие значительных мезомасштабных изменений, водные массы верхнего слоя воды (0 – 25 м) прогрелись до 25 °C и более. В этих условиях изменилось распределение содержания пигментов и эффективность фотосинтетических процессов по глубине. Максимальные значения обоих показателей состояния фитопланктона оказались на 10-15 м ниже, чем в предыдущие годы. Водоросли, полученные с верхних горизонтов (0-10 м), не восстанавливали своих фотосинтетических функций даже после длительной адаптации в темноте. Это позволяет предположить, что они испытали значительное фотоповреждение. Такой факт подтверждается ослаблением у этих водорослей защитной системы тушения избыточных возбужденных состояний ХЛ. Действительно, величины коэффициента нефотохимического тушения флуоресценции фитопланктонного сообщества верхнего перемешанного слоя в глубоководной части шельфа в августе 2002 года были значительно ниже, чем в 2000 году. Такое снижение адаптационных возможностей фотосинтетического аппарата к действию света высокой интенсивности, видимо, обусловлено изменениями температурного режима в поверхностных слоях в августе 2002 года.

Обследования видового состава микроводорослей в прибрежной части Черного моря в районе Геленджикской и Голубой бухт в августе – сентябре 2000 года выявило, что массовыми видами являются *Thalassionema nitzschioides*, *Dactyliosolen fragilissimus*, *Pseudonitzschia seriata* и *Gymnodinium wulfii*. Эти виды были выбраны для анализа распределения клеток по показателю эффективности фотосинтеза микрофлуориметрическим методом ([рис. 55](#)). Представители диатомовых *Th. nitzschioides* и *P. fragilissimus* находились в угнетенном состоянии. Около половины этих клеток обладали очень низким уровнем эффективности фотосинтеза. Исходя из данных, полученных на культурах водорослей и в природных популяциях, при уровне среднего значения $(F_m - F_0)/F_m$ ниже 0,3 прирост численности клеток водорослей прекращается. Поэтому распределение клеток *Th. nitzschioides* и *P. fragilissimus* по относительной переменной флуоресценции позволяет прогнозировать снижение численности этих видов. Большинство клеток *P. seriata* и представителя динофлагелят *G. wulfii* обладали высокой эффективностью фотосинтеза, что свидетельствует о благоприятных для них условиях и позволяет прогнозировать рост численности этих

видов. Через две недели после начала обследования значительно увеличилось относительное содержание клеток *G. wulffii*. То же, но в несколько меньшей степени, произошло и с клетками *P. sp.*, тогда как клетки *Th. nitzschoides* и *P. fragilissimus* стали встречаться эпизодически.

Состояние наиболее часто встречающихся видов микроводорослей в составе фитопланктонного сообщества прибрежной части Черного моря в сентябре 2002 г. приведено в табл. 7.

Таблица 7. Виды водорослей, вклад их биомассы в пересчете на углерод в общую биомассу фитопланктона, содержание фотосинтетических пигментов и переменной флуоресценции ($F_m - F_0$)/ F_m одиночных клеток. (Пробы воды из зоны «свала» (44° 32,8' с.ш. 37° 57,7' в.д.) в сентябре 2002 года; данные о составе фитопланктона получены И.Н. Сухановой; содержание пигментов в пересчете на ХЛ вычислено по значению интенсивности флуоресценции F_0 .)

Вид	Вклад биомассы, %	Содержание пигментов 10^{-12} г ХЛ/клетку			Fv/Fm, отн. ед.	
		Мин.	Макс.	Средн.	Макс.	Средн.
<i>Pseudosolenia calcar-avis</i>	56	0,54	19	5,5	0,55	0,09
<i>Dactyliosolen fragilissimus</i>	0,8	0,30	2,9	1,1	0,39	0,04
<i>Thalassionema nitzschioides</i>	0,8	0,27	2,0	0,96	0,43	0,17
<i>Cylindrotheca closterium</i>	0,01	0,42	2,4	1,1	0,63	0,28
<i>Pseudo-nitzschia seriata</i>	1,7	0,51	0,78	0,69	0,39	0,37
<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	6,0	0,3	0,9	0,51	0,23	0,04
<i>Chaetoceros affinis</i>	0,4	0,48	14	3,6	0,50	0,18
<i>Gymnodinium sp.</i>	0,5	0,27	12	3,7	0,60	0,36
<i>Prorocentrum lima</i>	1,5	4,4	13	8,7	0,59	0,48
<i>Prorocentrum micans</i>	3,5	5,1	21	12	0,47	0,19
<i>Prorocentrum cordatum</i>	0,45	1,1	3,0	2,2	0,59	0,41
<i>Scrippsiella trochoidea</i>	0,22	2,0	7,5	5,2	0,56	0,47
<i>Ceratium furca</i>	3,9	1,8	22	8,6	0,24	0,10
<i>Ceratium fusus</i>	1,2	2,5	19	8,3	0	0

Эти данные указывают на угнетенное состояние водорослей большинства представленных видов и подтверждают предположение о том, что обнаруженные в 2002 году изменения состояния фитопланктона по показателям фотосинтетической активности, а также изменения видового состава в июне 2001 года являются следствием общих климатических изменений. Однако для окончательных утверждений относительно стабильности состояния фитопланктонного сообщества Черного моря и влияния на него меняющегося климата материалов еще недостаточно.

Значительный интерес представляют данные о численности вида и содержании фотосинтетических пигментов в клетках водорослей, измеренные по величине F_0 . Они дают возможность оценить вклад отдельных видов в общее содержание фотосинтетических пигментов фитопланктонного сообщества. Учет эффективности фотосинтеза клеток позволяет оценить вклад данного вида в суммарную первичную продукцию фитоценоза.

Таким образом, использование микрофлуорометрического метода позволило получить данные для оценки функционального состояния фотосинтетического аппарата популяций микроводорослей и составить краткосрочный прогноз динамики их численности в данном фитоценозе.

В поверхностных водах под влиянием интенсивной инсоляции могут происходить существенные изменения в функционировании фотосинтеза водорослей и, соответственно, в параметрах флуоресценции. Эти процессы, известные как процессы полуденной депрессии фотосинтеза или фотоингибирования, обусловлены нефотохимическим тушением возбужденных состояний ХЛ. В связи с этим при определении обилия фитопланктона по показаниям флуоресцентных датчиков необходимо учитывать влияния инсоляции на флуоресценцию фитопланктона данного района путем введения поправочных коэффициентов. Степень фотоингибирования и снижения F_0 может существенно различаться для разных групп водорослей в различных условиях обитания. На рис. 56 представлены типичные результаты измерения флуоресценции фитопланктона во время стоянки судна на ст. 1606 с 4³⁰ утра до 14 часов дня методом проточной флуорометрии. При увеличении инсоляции в дневные часы наблюдается уменьшение F_0 . Уменьшение F_0 в некоторой степени коррелировало с уменьшением Fv/Fm, отражающей фотосинтетическую активность.

При снижении освещенности в вечернее время происходило восстановление значения F_0 и Fv/Fm. Степень ингибирования F_0 была максимальной в поверхностных слоях и сильно уменьшалась с глубиной по мере снижения подводной облученности. Величина уменьшения F_0 в дневные часы зависела от освещенности, скорости вертикального перемешивания воды и физиологического состояния фитопланктона. В частности, существенные различия наблюдаются в суточных изменениях F_0 в разных по трофности водах. При хорошей обеспеченности минеральным питанием (в прибрежных районах) значения F_0 в поверхностном слое не сильно изменяется в зависимости от уровня инсоляции в течение суток. При средней обеспеченности биогенами в открытых районах Черного моря и в отсутствие перемешивания наблюдается

существенное уменьшение F_0 (до 40%) в дневное время вследствие фотоингибирования. Значительный спад флуоресценции F_0 наблюдается при интенсивном облучении культур микроводорослей при недостатке элементов минерального питания. Кроме того, на ход суточной кривой флуоресценции F_0 и эффективности фотосинтеза может оказывать влияние таксономический состав водорослей. Например, высокое содержание кокколитофорид, практически не подверженных фотоингибированию, приводит к меньшим изменениям показателей флуоресценции ХЛ в зависимости от интенсивности облучения.

Для того чтобы оценить степень влияния инсоляции на интенсивность флуоресценции ХЛ F_0 , следует проводить адаптацию фитопланктона в темноте и исследовать процессы репарации фотоповреждения. Кривые восстановления значений F_0 после помещения проб воды в темноту для нескольких станций приведены на рис. 57. Видно, что в темноте происходит увеличение значений F_0 и восстановление активности F_v/F_m . Время восстановления составляет несколько часов. Эксперименты по ингибированию синтеза белка в клетках фитопланктона показали, что процесс репарации в значительной степени обусловлен синтезом хлоропластных белков. Избыточное облучение приводит к повреждению части белков РЦ ФСА. Частичное повреждение РЦ и энергетические затраты на репарацию белков снижают скорость роста и продуктивность водорослей.

Высокая инсоляция приводит к уменьшению переменной флуоресценции ХЛ (F_v/F_m). Снижение активности фотосинтетических процессов под воздействием избыточного света может быть обратимым и необратимым. Быстрое, в течение 15-20 минут, обратимое восстановление после прекращения избыточного освещения обусловлено регуляторными механизмами, предотвращающими поступление возбуждения к реакционным центрам за счет увеличения тепловой диссипации возбужденных состояний ХЛ. Медленное, в течение 2-4 часов, восстановление работы ФСА после фотоингибирования связаны с процессами ресинтеза белков РЦ. Степень фотоповреждения РЦ можно также определить по восстановлению параметров флуоресценции во время адаптации в темноте (рис. 58).

Процессы регуляции ФСА чрезвычайно важны для предохранения от появления большого количества неиспользуемых в биосинтетических реакциях восстановленных продуктов световой стадии фотосинтеза. Эти продукты, взаимодействуя с кислородом, приводят к генерации АФК и процессам ПОЛ, которые лежат в основе универсального механизма поражения клеток.

8.6. Пример оценки физиологического состояния древесных растений по характеристикам флуоресценции хлорофилла коры однолетних побегов.

Измерение флуоресценции ХЛ нашли широкое распространение для изучения реакции растения на повреждение. Основным объектом таких измерений является листья растений. Слой феллодермы в коре древесных растений содержит большое количество ХЛ, ассоциированного в ФСА и обладающего фотосинтетической активностью. Измерение характеристик флуоресценции ХЛ интактных побегов может значительно расширить возможности мониторинга состояния древесных растений, так как позволяет получать информацию о состоянии растения круглогодично. Появляется возможность проследить динамику вхождения растений в покой зимой и выход их из покоя весной, что важно для прогнозирования состояния растений. Реализация такого подхода сопряжена с некоторыми методическими трудностями, вызванными тем, что содержащий ХЛ слой феллодермы покрыт оптически плотным пробковым слоем, имеющим значительную оптическую плотность и высокое рассеяние. Тем не менее, при соответствующем выборе условий измерений на побегах различных древесных растений величина отношения F_v/F_m достоверно снижается под действием ингибиторов фотосинтеза, а также при ингибировании ФСА другими неблагоприятными факторами.

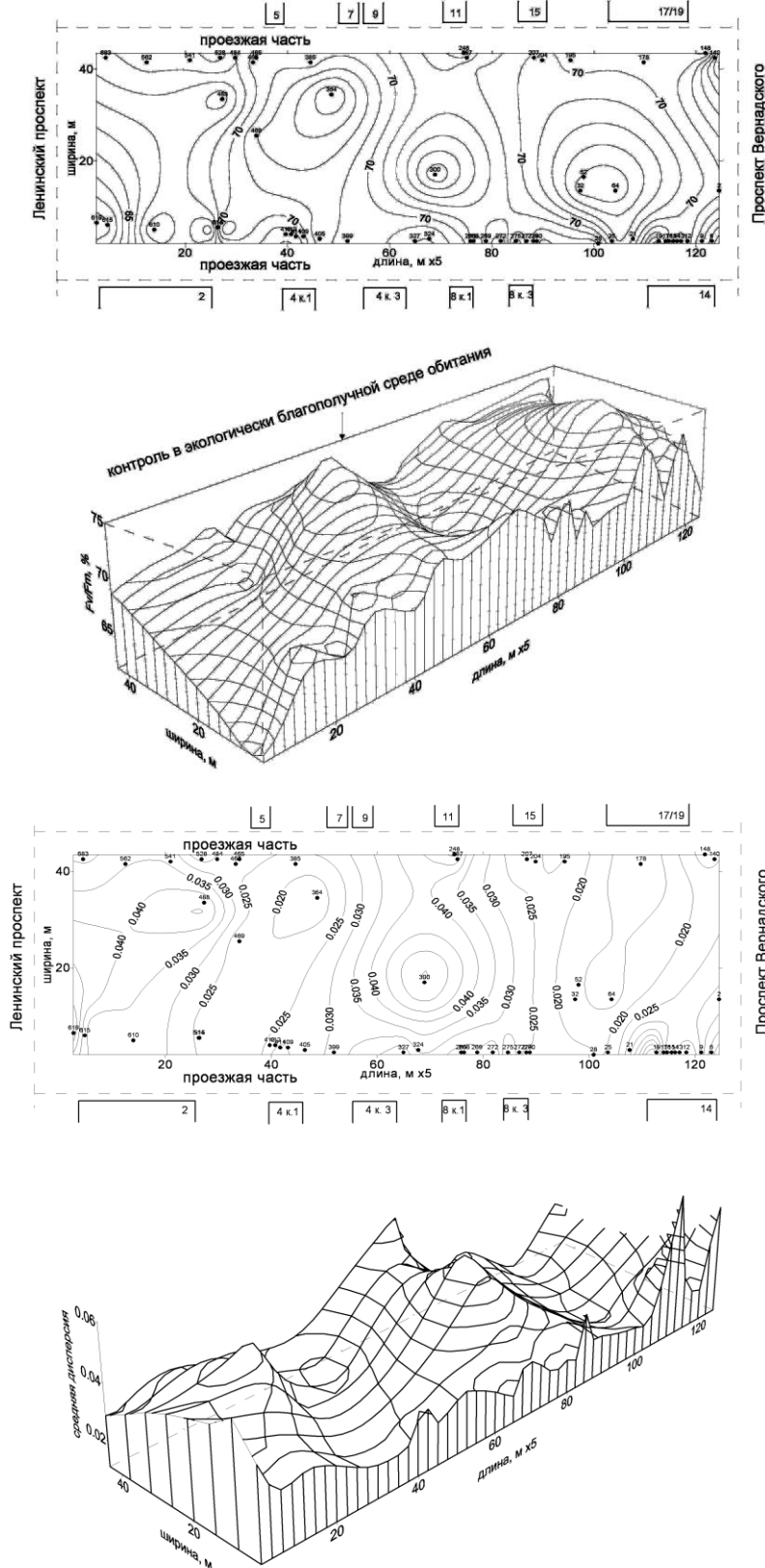


Рис.59. Средние значения переменной флуоресценции ХЛ феллодермы коры однолетних побегов *Tilia cordata*, произрастающих в сквере по улице Марии Ульяновой (А) и соответствующие значения дисперсии (Б).

флуоресценции ХЛ ассимиляционных тканей высших растений могут быть использованы для целей мониторинга состояния высших растений и оценки благополучия среды их обитания.

9. Связь структуры популяции с ее состоянием

9.1. Разнообразие ответных реакций индивидуумов в клеточных ансамблях и популяциях.

При помощи импульсной флуорометрической аппаратуры нами были проведены обследования состояния зеленых насаждений на нескольких улицах Москвы. В качестве примера на [рис. 59](#) представлены результаты обследования состояния ФСА однолетних побегов лип на сквере улицы Марии Ульяновой. Измерение переменной флуоресценции ХЛ проводили на однолетних побегах липы. На одном дереве измеряли по 10-15 побегов. Распределение растений по переменной флуоресценции показывает достоверное ухудшение состояния ФСА деревьев вблизи Ленинского проспекта и несколько в меньшей степени вблизи проспекта Вернадского (рис. 59 а). Особенно контрастно нарушение физиологического состояния деревьев проявляется при определении среднеквадратического отклонения значений F_v/F_m , вычисляемые по значению данного показателя на разных ветвях одного дерева (рис. 59 б). В благоприятных условиях отклонение от среднего значения F_v/F_m невелико. При этом все ветви имеют эффективность первичных процессов фотосинтеза близкую к максимальным значениям. В неблагоприятных условиях у одних ветвей величина F_v/F_m значительно понижается, когда другие ветви сохраняют практически нормальное значение переменной флуоресценции. Было обнаружено, что среднеквадратичные отклонения величины F_v/F_m по ветвям у деревьев, находящихся в разном физиологическом состоянии на одной территории, могут различаться в десять раз.

Таким образом, разработанные методы исследования показателей

Один из постулатов теории эволюции сводится к тому, что индивидуумы, образующие популяцию, не тождественны друг другу по множеству признаков.

Все природные популяции являются по тем или иным признакам гетерогенными, что справедливо и для культур одноклеточных организмов. Различия между клетками в популяции могут быть обусловлены генетической неоднородностью, фазой клеточного цикла и некоторыми фенотипическими особенностями. Принято считать, что генетически однородной является клонированная культура, образованная в результате вегетативного размножения из одной клетки. Однако, возможность существования такой популяции маловероятна. Даже одна клетка может обладать наследственным свойством расщепления на варианты. В популяциях микроорганизмов с численностью больше 10^8 клеток генетическая однородность невозможна в силу спонтанной мутаций, имеющих вероятность от 10^{-4} до 10^{-8} . Если учесть многократные пересевы при культивировании генетически однородные популяции не существуют. В однородной популяции бактерий может происходить расщепление на варианты, различающиеся по генетическим, физиолого-биохимическим и морфологическим признакам – диссоциация. Вероятность диссоциативных переходов у бактерий составляет 10^{-2} - 10^{-4} на одно клеточное деление. Высокая частота возникновения диссоциатов является одним из главных факторов приводящих к большой неоднородности популяций бактерий. Экспериментально показано, что устойчивость индивидуальных клеток патогенных микроорганизмов одного штамма к действию антибиотиков может различаться в 10 раз. Во всяком случае, природные популяции всегда генетически неоднородны.

Однако, кроме генетической неоднородности, существует и эпигенетическая неоднородность, обусловленная рядом причин и, прежде всего, физиолого-биохимическими изменениями клеток в ходе клеточного цикла. Свойства и показатели состояния популяции микроорганизмов являются усреднением свойств клеток, находящихся в разных фазах цикла развития и прошедших различное количество генераций. Образование клетками агрегатов повышает степень неоднородности индивидуальных клеток. Также причиной различия клеток могут быть локальные пространственные неоднородности условий среды.

9.2. Структура клеточной популяции как отражение ее функционального состояния.

Распределение физических объектов по какому-либо признаку принято считать Гауссовым. Например, диаметр шариков, изготовленных на заводе по одной технологии, действительно соответствует нормальному распределению.

Центральная предельная теорема: сумма большого количества независимых случайных величин имеет распределение, близкое к нормальному. Так как многие случайные величины являются суммами нескольких случайных факторов, центральная предельная теорема объясняет популярность нормального распределения. Другими словами, при действии на однородные объекты множества случайных факторов распределение объектов по какому-либо признаку является близким к нормальному (распределение Гаусса).

Распределения по какому-либо признаку особей в биологических популяциях, как правило, не описываются законом Гаусса. Отклонение полученного распределения от нормального может быть формально определено по величине непараметрического критерия χ^2 , а также по величинам коэффициентов асимметрии и эксцесса.

Известно, что многие процессы клеточного метаболизма могут иметь собственные ритмы. Одной из причин функциональной неоднородности клеток могут быть собственные ритмы активности или ритмы, навязанные извне. Интересно рассмотреть влияние гармонических колебаний на кривую распределения особей по какому-либо признаку. Предположим, что все объекты распределены по какому-либо признаку нормально и по гармоническому закону изменяют значение этого признака независимо друг от друга. Модель показывает, что такое распределение, получаемое в каждый момент времени, не может быть Гауссовым.

С.С.Шварц сформулировал следующее правило: «Если распределения отдельного признака асимметричны, то можно предположить, что происходит отбор, направленный на изменение средней нормы изменчивости популяции путем преимущественной элиминации наименее приспособленных к данным условиям организмов при нормальном или ускоренном росте индивидов, приспособленных к данным условиям. Если же состояние популяции на данном этапе ее развития стабильно и эта стабильность поддерживается отбором, то изменчивость отдельных признаков у особей данной популяции должна подчиняться закону нормального распределения».

Это значит, что существенное (по критерию χ^2) отклонение от нормального распределения особей по какому-либо признаку указывает на изменения стационарных условий жизни популяции.

Характер распределения по какому-либо функциональному признаку может значительно более полно характеризовать состояние популяции, чем значение средних величин этого признака. Например, изменения состояния микроводорослей при старении культуры, действии токсических веществ, нехватки биогенов в среде, конкурентном вытеснении одного вида другим и смене фаз цветения фитопланктона в естественных условиях сопровождается изменениями распределения особей в популяции по избранному признаку.

В принципе это касается любого признака. Однако наиболее целесообразно определять и анализировать признаки, жизненно важные для организма, характеризующие его энергетические балансы, скорости потребления или продукции каких-либо субстратов, синтез белка и т.д. Например, для животных

клеток можно определять индекс пролиферативной активности, основанный на количественном соотношении содержания РНК и ДНК при окраске нуклеиновых кислот клетки акридиновым оранжевым. Для водорослей целесообразно использовать признак, характеризующий состояние ФСА. Таким признаком, соответствующим эффективности первичных процессов фотосинтеза, является флуоресценция ХЛ. Для исследования гетерогенности водорослей могут быть использованы измерения индукции флуоресценции ХЛ индивидуальных клеток и значения эффективности первичных процессов фотосинтеза (относительной переменной флуоресценции ХЛ).

9.3. Связь функциональной структуры популяции с динамикой численности одноклеточных водорослей.

Продукционный процесс в ходе культивирования фототрофных микроорганизмов осложнен особенностями поглощения биогенных веществ, накопления биомассы и деления клеток водорослей. Его не следует представлять, как непрерывный параллельный процесс деления клеток с одновременным накоплением биомассы и утилизацией биогенных веществ. Эксперименты с накопительными культурами фитопланктона показали, что процесс роста численности клеточных популяций складывается из трех стадий (рис.). На первой стадии происходит поглощение клетками биогенных веществ и их накопление без увеличения численности клеток. На второй - деления клеток при одновременном потреблении вещества из среды. А на третьей - деления клеток без потребления веществ из среды за счет внутренних запасов питательного вещества. Данные стадии могут быть перекрывающимися и редуцированными. Стадии могут лишь частично совпадать с фазами, выявляемыми по кривым роста [Левич, 2012].

Типичная зависимость прироста численности клеток в условиях лимитирования по интенсивности света в процессе культивирования водорослей от величины переменной флуоресценции ХЛ клеток (F_v/F_m), соответствующая эффективности первичных процессов фотосинтеза, представлена на рис. . Положительный прирост численности соответствует величине $F_v/F_m > 0,3$. С ростом переменной флуоресценции ХЛ прирост численности приобретает ускорение. Таким образом, в ряде случаев по величине средних значений переменной флуоресценции ХЛ возможно прогнозировать динамику численности популяции водорослей. Однако такие зависимости выполняются только в условиях, когда скорость роста водорослей ограничивается недостаточной интенсивностью света при выращивании. В случае культивирования водорослей при более высокой (не лимитирующей скорости роста) интенсивности света наблюдается меньшее значение F_v/F_m по сравнению с медленнее растущей на слабом свете культурой водорослей. Возможно, это обусловлено повышением соотношения закрытых и открытых реакционных центров и, соответственно, увеличением уровня флуоресценции F_0 и снижением F_v . При этом система синтеза белка D1 не полностью компенсирует естественную деструкцию, вызываемую интенсивным светом, и соотношение закрытых и открытых реакционных центров поддерживается на несколько более высоком стационарном уровне. Снижение F_v/F_m в таких условиях может сопровождаться значительным приростом численности клеток водорослей. В условиях избытка световой энергии эффективность ее утилизации не имеет значения. Более значимыми для возможностей увеличения численности водорослей в таких условиях представляются процессы диссипации избыточной для фотосинтетического аппарата энергии поглощенного света, защиты от усиления генерации активных форм кислорода, снижение их концентрации и активизация процессов репарации.

В ходе накопительного культивирования водорослей происходят изменение функциональной структуры популяции.

На рис. 4 приведена одна из типичных для различных видов водорослей зависимостей структуры популяции от времени культивирования. Как видно из рисунка, фазы экспоненциального и линейного роста характеризуются относительно высокой однородностью, которая снижается в ходе культивирования. На стадии насыщения прироста численности клеток распределение становится двухвершинным за счет появления клеток с очень низким значением переменной флуоресценции ($F_v/F_m < 0,2$), видимо, соответствующих отмирающим особям. Такие клетки не накапливаются в популяции по причине усиления окислительного повреждения или включения механизмов апоптоза при достижении предельного уровня повреждения фотосинтетического аппарата или нарушения нативности ДНК. В популяциях водорослей, видимо, практически всегда даже при оптимальных условиях культивирования происходит деградация некоторой части клеток.

9.4. Связь функциональной структуры популяции одноклеточных водорослей с дефицитом биогенов или присутствием токсических веществ.

В природных условиях водоросли часто испытывают дефицит тех или иных биогенов, в частности, азота. Азотное голодание водорослей вызывает ряд изменений фотосинтетического аппарата и снижает эффективность процессов фотосинтеза. Такие явления вызваны нарушением работы реакционных центров в связи с торможением синтеза белков и, в частности, белка D1. Кроме отмеченных выше общих изменений состояния фотосинтетического аппарата азотное голодание вызывает изменение структуры популяции водорослей.

На рис. 5 приведены гистограммы распределения клеток термофильного штамма *Chlorella vulgaris*, по относительной переменной флуоресценции и содержанию хлорофилла при исключении из среды культивирования соединений азота. Исключение азота из питательной среды уже через 6 ч приводит к снижению средних значений эффективности первичных процессов фотосинтеза (F_v/F_m). Дальнейшее

азотное голодание приводит к понижению средних значений переменной флуоресценции ХЛ. При этом характер распределения клеток по данному показателю практически не меняется. Следует отметить, что при достаточно длительном дефиците элементов минерального питания (72 ч и более) не остается клеток, обладающих высоким значением F_v/F_m . Видимо, это обусловлено тем, что в популяции не может быть особей нечувствительных к дефициту биогенных элементов.

Действие на водоросли токсических соединений, таких как тяжелые металлы уже через сутки после добавления токсического вещества происходит снижение численности клеток и значительное увеличение неоднородности клеток на фоне снижения средних значений эффективности процессов фотосинтеза, определенной по параметрам флуоресценции хлорофилла (F_v/F_m). При этом сохранившиеся клетки обладают более высоким уровнем относительной переменной флуоресценции, чем в контроле. По прошествии длительного времени (3-4 суток) фаза угнетения сменяется ростом численности культуры, а в последующие дни темпы прироста численности могут оказаться несколько выше, чем в контроле. Видимо, в этих условиях в среде культивирования концентрация тяжелых металлов значительно понижается за счет их связывания в нерастворимые соединения, а сохранившие высокую эффективность фотосинтеза клетки обеспечили высокий прирост их численности.

Таким образом, полное отсутствие в популяции эффективно функционирующих особей на фоне пониженных средних значений F_v/F_m свидетельствует о дефиците элементов минерального питания в среде. При этом гетерогенность клеток, определяемая величиной среднеквадратичного отклонения по данному признаку, невелика. Присутствие в популяции даже небольшого количества клеток, сохранивших высокую эффективность фотосинтеза, свидетельствует о воздействии на популяцию каких-либо цитотоксических агентов, к которым индивидуальная чувствительность клеток сильно различается.

9.5. Влияние фотоокислительного повреждения на неоднородность клеток водорослей в популяции.

Свет высокой интенсивности может приводить к фотоокислительному повреждению фотосинтетического аппарата растительных объектов. Такое повреждение не одинаково влияет на индивидуальные клетки. На рис. 6 показано распределение клеток *Th. weissflogii* по относительной переменной флуоресценции в зависимости от времени облучения видимым светом с плотностью мощности 8 ммоль квантов $\cdot$ м $^{-2}$ с $^{-1}$. Уже после 30 мин облучения отмечали снижение среднего значения переменной флуоресценции с 0.58 до 0.31 (рис. 6 б). После 90 мин облучения большая часть клеток теряла фотосинтетическую активность. Однако, даже при больших дозах облучения сохранялись клетки с высокими показателями эффективности фотосинтеза (рис. 6 в). Через сутки после 90-минутного облучения в популяции наблюдали как клетки с высокой переменной флуоресценцией, так и клетки, утратившие фотосинтетическую активность, причем доля первых составляла уже около 70% (рис. 6 г). Аналогичные данные были получены при действии света высокой интенсивности и на представителе зеленых водорослей *A. falcatus*. В отличие от *Th. weissflogii* *A. falcatus* обладает большей чувствительностью к фотоокислительному повреждению. Приблизительно равные эффекты повреждения ФСА на зеленых водорослях проявляются при вдвое меньших временах облучения, чем на диатомеях.

Исследования отдельных клеток в популяции водорослей показали, что не все клетки теряют свою активность при облучении большими интенсивностями видимого света. В этих условиях сохраняются клетки с высокими показателями фотосинтетической активности. Возможно, именно наличие части клеток с высокой относительной переменной флуоресценцией, сохраняющейся даже после больших доз облучения, обеспечивает адаптацию и устойчивость популяций в целом к условиям фотоокислительного повреждения в природных условиях.

Характерно очень малое количество клеток с переменной флуоресценцией 0,1-0,3 через сутки после окончания облучения. Вероятно, часть клеток восстанавливает фотосинтетическую активность (клетки с $F_v/F_m = 0,5-0,7$). Часть же клеток отмирает. Возможно, что такое отмирание связано не только с повреждениями фотосинтетического аппарата, но при этом начинают работать механизмы апоптоза. Не исключено, что у водорослей процесс запрограммированной гибели клеток реализуется в условиях глубокого повреждения ФСА за счет фотодинамического действия ХЛ, не ассоциированного с ФСА.

9.6. Изменения состояния ФСА клеток при совместном культивировании двух видов водорослей.

Изменения функциональной структуры популяций двух видов водорослей *Chlorella vulgaris* и *Ankistrodesmus acicularis* при их совместном культивировании представлены в табл. 2. В начале совместного культивирования обе культуры имели близкую численность клеток, но значительно различались по эффективности фотосинтеза. К 37-м суткам в конкурентной борьбе побеждает *Ch. vulgaris*. Этот вид водорослей обладает более высокой эффективностью фотосинтеза, чем *A. acicularis*. В популяции *A. acicularis* более 10% клеток имеют значение относительной переменной флуоресценции ниже 0,1, что указывает на практически полное нарушение работы фотосинтетического аппарата этих клеток.

Таким образом, модельные эксперименты показывают принципиальную возможность оценки исхода конкурентной борьбы популяций разных видов, занимающих общую экологическую нишу. Главным

признаком, определяющим динамику численности и выживание популяции, при этом является эффективность утилизации поступающей энергии. Такие модельные эксперименты создали предпосылки для создания методологии прогнозирования динамики численности индивидуальных видов водорослей в водном фитопленке в природных условиях.

Таблица 2. Изменение числа клеток (N) и переменной флуоресценции ХЛ (Fv/Fm) при совместном культивировании *Chlorella vulgaris* и *Ankistrodesmus acicularis*.

Время культивирования, дни	<i>Chlorella vulgaris</i>		<i>Ankistrodesmus acicularis</i>	
	N($\times 10^6$) кл/мл	Fv/Fm	N($\times 10^6$) кл/мл	Fv/Fm
5	2,4	0,64	2,0	0,52
16	4,2	0,66	5,4	0,35
37	7,3	0,59	2,8	0,30
56	15	0,55	1,0	0,25

9.7. Оценка состояния популяции и прогнозирование динамики численности природных популяций водорослей на основе неоднородности клеток.

Массовое увеличение численности водорослей – «цветение» происходит в определенные сезоны и приводит к значительным изменениям биотических и абиотических показателей водной среды. Весной 1988 г. в центральной части Черного моря наблюдалось цветение диатомовых водорослей и, в частности, *Nitzschia delicatissima*, когда этот вид абсолютно доминировал по численности и биомассе в фитопланктонном сообществе (15 рейс НИС «Витязь»). В начале марта «цветение» *N. delicatissima* сформировалось, достигнув стационарной фазы, и распространилось на весь верхний перемешанный слой воды (на глубинах от 0 до 60 м). В апреле происходил «распад цветения» - снижение численности водорослей, начавшееся с верхних горизонтов. На **рис. 7** представлены изменения распределения содержания ХЛ в водной толще и распределения по относительной переменной флуоресценции ХЛ клеток *N. delicatissima* в марте и апреле для центральной части Черного моря в зависимости от глубины. На больших глубинах в слое 40-58 м распределение клеток по переменной флуоресценции мало отличается от исходного. На этом горизонте не происходит и значительного изменения содержания ХЛ в фитопланктоне водной толщи и численности клеток водорослей. В то же время наблюдается значительное снижение численности *N. delicatissima* в верхних горизонтах, которое сопровождается уменьшением среднего значения переменной флуоресценции на клетку и значительной асимметрией распределения по этому показателю. Такие изменения параметров флуоресценции ХЛ характерны для повреждения ФСА клеток культур водорослей при действии света высокой интенсивности. Вероятно, что ведущее значение в процессе весеннего «распада цветения» в Черном море имеет фотоповреждение. В этот период на фоне значительного повышения уровня инсоляции происходит обеднение верхних горизонтов элементами минерального питания за счет их поглощения быстро растущим фитопланктоном. Это создает дефицит минерального питания, который приводит сначала к фотоингибированию, а затем фотодеструкции ФСА водорослей и гибели клеток. Конечно, такое объяснение несколько упрощает сложные явления сезонной сукцессии, в которой большое значение имеют многие факторы среды, в том числе и биотические.

Тем не менее, изложенный способ определения функционального состояния индивидуальных клеток в условиях эпизодического отбора проб фитопланктона позволяет оценить направленность развития доминирующих видов водорослей и прогнозировать динамику их численности при относительной стабильности внешних условий в ближайшем будущем. Таким образом, распределение особей по какому-либо признаку позволяет прогнозировать развитие популяции и определить наступление изменений во внешней среде. В настоящее время биофизические методы в сочетании с новейшими технологиями предоставляют большие возможности в использовании анализа состояния популяций клеток для оценки состояния среды.

**Обычно для анализа и представления результатов распределения особей по какому-либо признаку используют гистограммы. Корректное представление распределения особей по признаку требует большого экспериментального материала. Как правило, 50-60 особей являются минимальным количеством для проведения статистически значимого анализа состояния популяции. Немаловажным является и способ отображения распределения при помощи гистограммы. Статистические оценки, количество групп на гистограмме (бинов) следует определить по формуле $N \sim 3,3 \lg n$, где n - количество проанализированных особей.*

9.8. Типизация особей в популяциях.

Часто возникает ситуация, при которой от одного объекта можно зарегистрировать несколько признаков. Тогда следует использовать многомерную статистику. На примере популяции водорослей можно рассмотреть универсальный подход к типизации особей. В популяции микроводорослей присутствуют клетки, находящиеся в различных физиологических состояниях и отличающиеся по реакциям ФСА на действие света. Это проявляется в различных формах индукционных кривых флуоресценции хлорофилла

этих клеток. Использование микрофлуориметрического метода позволяет зарегистрировать множество кривых индукции флуоресценции одиночных клеток. Набор таких кривых может быть показателем функциональной неоднородности особей в популяции.

Хлорококковая водоросль *Scenedesmus quadricauda* при нормальных условиях культивирования образует 4-клеточные ценобии. В качестве базы для анализа функциональной структуры этой водоросли в процессе культивирования было зарегистрировано 2547 кривых индукции флуоресценции от ценобиев. Исходными признаками, по которым оценивали форму кривых индукции флуоресценции, были величины интенсивности флуоресценции, измеренные в фиксированные моменты времени от 0 до 200 с. Впрочем, набор признаков для системы типизации особей может быть каким угодно, вплоть до качественных признаков. В качестве переменных для оценки различных типов кривых индукции флуоресценции использовали разности логарифмов интенсивностей в последовательные моменты времени. Анализ коэффициентов корреляции позволил оставить 6 признаков, характеризующих каждую клетку. Затем было проведено линейное преобразование шкал всех 6 признаков, так, что каждый из них оказался в диапазоне от 0 до 1. Для классификации объектов был использован один из методов кластерного анализа - метод К-средних (Дюран, 1977). Этот метод предусматривает априорное задание числа кластеров. Критерий «удачности» проведения кластеризации основан на сопоставлении среднего межкластерного евклидова расстояния и среднего расстояния от центра кластера до его крайнего элемента, а также отсутствие кластеров с очень малым числом элементов.

Таким критериям наиболее полно удовлетворяло разделение популяции на 8 кластеров, соответствующих типам кривых индукции флуоресценции (рис. 8). Следует отметить, что при таком способе классификации среднее расстояние между кластерами в 2,8 раза превосходило среднее расстояние от центра кластера до его крайнего элемента. Пространство признаков, таким образом, обладало значительной дискретностью. На это указывает полное отсутствие объектов в пространстве между кластерами. Это пространство составляет более 95% всего пространства признаков. Такое положение может быть объяснено тем, что различные типы кривых индукции флуоресценции отражают смены участков лимитирования ЭТЦ фотосинтеза или ключевые переключения ее регуляторных механизмов.

Предложенный способ классификации объектов по кривым индукции флуоресценции хлорофилла был использован для анализа структуры популяции *S. quadricauda* по относительному обилию каждого типа клеток на различных этапах роста культуры, а также при действии на нее гербицидов $3 \cdot 10^{-5}$ М диурона и 10^{-6} М метилвиологена. Для удобства представления результатов не в форме обширных таблиц, а в графическом виде, был проведен еще один кластерный анализ сходства обилия элементов в каждом кластере по ходу развития популяции. За меру сходства брали так называемую манхеттенскую метрику (МНМ):

$$МНМ = \sum (p_{ik} - p_{jk})$$

где p_{ik} - относительное обилие k -го типа клеток в i -й день, p_{jk} - то же, но в j -й день.

В экологической практике эта мера известна под названием «процентная разница» (Whittaker, 1980), где она используется при оценке видового состава сообщества. Поскольку аналогия между таксономическим составом сообщества и типологическим составом популяции вполне оправдана, представляется оправданным и выбор данной меры сходства. Наглядное представление матрицы манхеттенских расстояний получали при помощи метода нематричного метода многомерного шкалирования в пространстве 2-х измерений (рис. 9). Расстояния между точками на этой диаграмме линейно коррелированы с манхеттенскими расстояниями между соответствующими пробами. Рядом с каждой точкой цифрой указан день от начала опыта. Ломаная линия, соединяющая точки в хронологическом порядке, образует своего рода «эволюцию популяции» в пространстве обобщенных переменных. Полученная в таком виде связь между фазами роста и функциональной структурой популяции установлена по относительному обилию особей с определенными типами кривых индукции флуоресценции. Как видно на рис. 9, показатели состояния популяции сразу после посева в стадии лаг-фазы весьма близки к стадии стагнации. Переход в фазу линейного роста численности сопровождается существенным изменением функциональной структуры популяции. Представленный подход может быть использован для оценки фазы развития популяции водорослей и прогнозирования динамики ее численности.

В результате окислительного повреждения, вызванного введением в суспензию водорослей гербицида метилвиологена, функциональная структура популяции водорослей существенно изменяется. При этом некоторые клетки полностью сохраняют свое функциональное состояние и соответствующую кривую индукцию флуоресценции. Метилвиологен является гербицидом, механизм действия которого основан на окислительном повреждении ФСА. Это происходит в результате усиления генерации АФК, которые образуются за счет переноса электронов с акцепторной стороны ФС1 на кислород. Выращивание культуры *S. quadricauda* с 10^{-6} М метилвиологена приводило к некоторому торможению скорости роста и существенным изменениям структуры популяции водорослей. При дальнейшей инкубации водорослей с метилвиологеном происходит частичное восстановление фотосинтетической активности клеток. Проведение многомерного шкалирования, аналогично рассмотренному выше, выявляет значительные различия между областями, соответствующими развитию популяции водорослей в норме и при действии повреждающего фактора (рис. 9).

Представленный на том же рисунке эффект действия на культуру *S. quadricauda* другого гербицида - диурина показывает, что такой анализ позволяет различать токсические агенты по механизму действия на ФСА и, соответственно, кривые индукции флуоресценции. На лабораторной культуре и на природных популяциях водорослей показаны возможности использования разработанного нами метода классификации и анализа кривых индукции флуоресценции хлорофилла для анализа функциональной структуры популяции и оценки ее состояния.

Представленный метод оценки состояния популяций водорослей на основе анализа кривых индукции флуоресценции ХЛ индивидуальных клеток позволяет прогнозировать развитие клеточной популяции. Разработанный алгоритм многомерного кластерного анализа популяции позволяющий использовать любые объекты и любые переменные.

В силу того, что индукция флуоресценции хлорофилла не имеет видовой специфичности, типизацию особей природной популяции *Pyrocystis pseudonocitiluca* - одного из массовых пелагических видов фитопланктонного сообщества центральной Атлантики (23 рейс НИС «Витязь», 1991 г. **Рис. 10** а), можно было проводить аналогично лабораторным культурам водорослей. Для выявления различий клеток *P. pseudonocitiluca*, вызванных долговременной адаптацией ФСА к условиям подводной освещенности, данные измерения индукции флуоресценции хлорофилла объединили в четыре группы: 10-15, 40-50, 70-80 и 120-150 м. Результаты кластерного анализа популяции *P. pseudonocitiluca* в зависимости от глубины обитания приведены на рис. 10 б. Проекция распределения по типам кривых индукции флуоресценции этих клеток представляет области, соответствующие различию функциональной структуры популяций на разных глубинах.

Аналогичный алгоритм был использован также для исследования функциональной структуры черноморской популяции водорослей вида *Ceratium fusus*. Имея данные химического анализа воды на станциях отбора проб, содержащих *C. fusus*, можно было разделить их по содержанию азота. Содержание азота на глубине 10 м в пробах воды вблизи о. Змеиный и на Филлофорном поле более чем в 50 раз превышало значение этого показателя в центральной части Черного моря в приповерхностном слое. Результаты кластерного анализа показали значительные различия состояния ФСА популяций водорослей, адаптированных к различным внешним условиям, в частности, к содержанию в воде азота. При этом кривые индукции флуоресценции ХЛ некоторых клеток из разных популяций могут практически совпадать. Различия между ними проявляются в относительном обилии клеток, имеющих соответствующий тип кривой индукции флуоресценции.

Представленный алгоритм многомерного кластерного анализа, позволяющий классифицировать клетки водорослей, может быть использован для анализа функциональной структуры не только популяций водорослей в лабораторных культурах и природной среде, но также может быть применен к любым популяциям.

10. Проблемы оценки состояния среды и некоторые системы экологического мониторинга

10.1. Проблема оценки состояния водной среды.

Описание проблем оценки состояния окружающей среды в широком понимании, включающим атмосферу, почву, воду, не может быть достаточно конкретным. Поэтому данный раздел посвящен только оценке состояния водной среды. Часто оценку состояния среды обитания сводят к определению вредных факторов и присутствию токсичных загрязняющих среду веществ антропогенного происхождения. Т.Эдмондсон (W.T.Edmondson) в своей книге «Практика экологии» приводит рассуждения о том, что такое «загрязнение» воды. По одному из определений: «Загрязнение воды состоит в добавлении к воде чего-то, что изменяет ее природные качества» или «Загрязнение воды состоит в добавлении в нее чего-то, что исключает возможность использовать ее наилучшим образом». Первое определение подразумевает существование ненарушенного состояния воды, которое изменяется в результате деятельности человека. Второе предполагает пригодность воды для использования в тех или иных целях человеком, но при этом не ясно, что понимает автор под «использованием воды наилучшим образом». Видимо, для выработки критерия состояния среды обитания следует определить цель такой оценки.

Кроме антропогенных загрязнений среды в ряде случаев встречаются «природные загрязнения», когда по естественным причинам, без вмешательства человека, сложились неблагоприятные или даже опасные условия. Существуют акватории, где месторождения нефти расположены под морским дном на малой глубине, и нефть может просачиваться сквозь грунт и всплывать на поверхность воды. Во многих эвтрофных озерах образуются плотные популяции токсичных цианобактерий без вмешательства человека. Вблизи месторождений полезных ископаемых природные воды могут содержать токсичные вещества в летальных концентрациях. В природных водах может содержаться значительное количество сероводорода, способного вызывать токсические эффекты. Многие источники природной воды имеют чрезвычайно низкое содержание минеральных элементов и систематическое потребление такой воды может вызвать ряд серьезных заболеваний от нарушения водно-солевой баланс организма до зоба, обусловленного недостатком йода.

В настоящее время выработано несколько подходов к оценке состояния среды обитания. Формально наиболее простой способ оценки состояния среды, развиваемый с середины прошлого века, заключается в

сопоставлении содержания компонентов среды с предельно допустимыми концентрациями (ПДК) вредных веществ. Именно этот способ оценки состояния среды вошел в систему отраслевых стандартов. Под ПДК понимают максимальную концентрацию вредного вещества, которая за определенное время воздействия не влияет на здоровье человека и его потомство, а также на компоненты экосистемы и природное сообщество в целом. Нормативы ПДК определяют методом биотестирования в лабораторных условиях *in vitro* в краткосрочных (дни) и пролонгированных (недели) опытах. Их проводят на изолированных популяциях, принадлежащих к небольшому числу тестовых видов. Критерием воздействия служит ограниченный набор физиологических и поведенческих реакций подопытных организмов на невзаимодействующие друг с другом вещества. ПДК не должны вызывать каких-либо патологических изменений или заболеваний, обнаруживаемых современными методами исследований. Такое определение ПДК несет в себе неопределенность в связи с тем, что совершенствование методов обследования может дать новую информацию о воздействии на различные биологические объекты исследуемых веществ и привести к необходимости пересмотра значений ПДК. В разных странах принятые значения ПДК не одинаковы и периодически пересматриваются. Это показывает, что принятые значения ПДК не являются строго обоснованными.

Использование ПДК для оценки качества среды имеет много недостатков и главные из них, видимо, следующие: несоответствие между лабораторными моделями и реальной экосистемой, отсутствие учета специфики функционирования экосистем в разных природно-климатических зонах, практическая невозможность оценки совместного действия нескольких веществ. Реакции живых систем на разнообразные химические и физические факторы в их сочетании могут характеризоваться интегральностью и кумулятивностью, а также парадоксальностью эффектов малых доз. Кроме того, обследование с позиций ПДК может описывать только токсическую сторону воздействия среды, но ни как не учитывает дефицит каких-либо компонентов в ней. ПДК являются определенными нормами падающего воздействия загрязняющих веществ на здоровье человека и природную среду. Химические методы оценки качества окружающей среды очень важны, однако они не дают прямой информации о биологической опасности загрязняющих веществ - это задача биологических методов. Таким образом, использование подходов, основанных на использовании ПДК для оценки состояния окружающей среды, представляется технически сложным и при этом недостаточно информативным.

Множественность и разнообразие факторов, формирующих окружающую среду, вынуждают искать интегральные характеристики состояния среды. Такой интегральной характеристикой, способной отразить экологическое состояние среды, может быть биотестирование и/или биоиндикация, которые показывают, как чувствует себя организм или сообщество организмов в данных условиях. Одним из наиболее удачных методов биотестирования среды, способных дать интегральную оценку токсичности, следует признать тестирование среды при помощи биолюминесцирующих бактерий. Некоторые виды морских бактерий обладают способностью излучать свет. Хемилюминесцентная реакция, непосредственно сопровождаемая свечением, катализируется ферментом - бактериальной люциферазой и включает в себя процессы окисления восстановленного флавиномононуклеотида ФМН-Н₂ до ФМН и одновременно алифатического (C14) альдегида до миристиновой (C14) кислоты. Эта реакция протекает, по-видимому, через стадию образования пероксида флавиномононуклеотида:



где: E - люцифераза, ООН - гидроперекисная группа, RCOH - алифатический альдегид, RCOOH - жирная кислота, образующаяся при окислении альдегида.

Данная биохимическая реакция сложна, многостадийна и скорость ее протекания зависит от наличия в клетке восстановленных эквивалентов. Люминесцентные бактерии сочетают в себе различные типы чувствительных структур, подверженных повреждению (клеточная мембрана, метаболические реакции, генетический аппарат). Поэтому на биолюминесцентную реакцию могут оказывать влияние токсические вещества разной природы и механизмов действия. Таким образом, чрезвычайно широкий круг токсинов способен снижать интенсивность свечения бактерий.

Методики оценки токсичности основаны на определении изменений интенсивности биолюминесценции бактерий при воздействии на них веществ, присутствующих в анализируемой пробе, по сравнению с контролем. Методики оценки токсичности дают быстрый (от 5 до 30 мин) ответ. Такая методика дает объективную, количественную характеристику воздействия токсических веществ на целостную систему биохимических реакций, протекающих в бактериальных клетках. Критерием токсического действия является изменение интенсивности биолюминесценции тест-объекта в исследуемой пробе по сравнению с контрольной пробой, в которой нет токсических веществ. Уменьшение интенсивности биолюминесценции пропорционально токсическому эффекту.

В настоящее время для оценки экологического состояния среды всё шире распространяется «вероятностный» подход, развиваемый ЕРА (Управлением по охране окружающей среды США) с начала 1980-х годов. В этой концепции («Оценка риска») учтена возможность совместного действия вредных факторов, причём их весовые коэффициенты могут меняться, в зависимости от *симбатности* (мера схожести зависимостей в математическом анализе) или *аддитивности* действия этих факторов. Могут быть учтены дополнительные параметры — половозрастные или генетические особенности популяции, для которой проводится оценка риска. Такой подход исключает использование жёстко фиксированных ПДК, заменяя их специальными исследованиями оценки риска, более обоснованными и информативными. В предельном случае оценка риска может дать и значения предельных концентраций (уровней) вредных факторов, практически совпадающих с ПДК.

Одним из подходов для преодоления трудностей, связанных с применением нормативов ПДК, могут стать данные биологического и физико-химического мониторинга. Их совокупность может дать возможность перейти к экологически допустимым нормативам (ЭДН) потенциально вредных для биоты факторов среды, которые устанавливаются непосредственно по данным мониторинга (А.П.Левич и др.). Для реализации данного подхода необходимо получение базы данных экологического мониторинга и метода установления ЭДН по этим данным. Метод установления ЭДН по данным мониторинга разработан сотрудниками кафедры экологии Биологического факультета МГУ под руководством В.Н.Максимова. В своих работах эта группа исследователей использовала данные биологического мониторинга качества вод по числу видов-индикаторов, относительной численности видов-индикаторов в полном сообществе и индексу сапробности сообщества. (*Сапробность водоема - характеристика степени загрязненности водоема органическими веществами. Сапробность водоема устанавливается по видовому составу обитающих в нем организмов-сапробионтов. Различают олигосапробные, мезосапробные и полисапробные водоемы.*).

Как следует из описанного выше подхода, для установления экологически допустимых нормативов вредных воздействий необходимы данные экологического мониторинга. В России основные концепции экологического мониторинга были заложены еще в 70-х гг. академиком Ю. А. Израэлем. По его мнению, мониторинг окружающей среды представляет собой систему наблюдений, оценки и прогноза антропогенных изменений состояния абиотических компонентов биосферы, ответной реакции экосистем на эти изменения и антропогенных изменений в экосистемах, связанных с воздействием хозяйственной деятельности. Таким образом, в систему экологического мониторинга должны входить наблюдения за состоянием элементов биосферы и наблюдения за источниками и факторами антропогенного воздействия. В соответствии с приведенными определениями и возложенными на систему функциями, мониторинг включает три основных направления деятельности: наблюдения за факторами воздействия и состоянием среды, оценку фактического состояния среды и прогноз состояния окружающей природной среды.

Традиционные биологические методы, используемые для мониторинга вод, имеют ряд принципиальных недостатков. Процедура подготовки проб воды для их анализа под микроскопом и определение видовой принадлежности водорослей весьма трудоемка, требует высокой квалификации и пока не поддается автоматизации. Кроме того, при определении численности клеток фитопланктона допускается чрезвычайно большая погрешность. При подсчете редких видов в составе фитопланктонного сообщества ошибка подсчета достигает 100% (Федорова, 1979). Видимо, в настоящее время необходимо создавать базу данных экологического мониторинга, основанную на современных количественных физико-химических методах определения обилия и функционального состояния как фитопланктонного сообщества в целом, так и отдельных его компонентов.

10.2. Технологические перспективы мониторинга воды.

Наиболее подходящим на роль объекта, отражающего состояние водной среды является фитопланктон. В крупных водных экосистемах фитопланктон является главным источником органического вещества и фундаментом практически всех пищевых цепей. Фитопланктон распространен повсеместно во всем верхнем слое любого наземного водоема. Обилие фитопланктона и показатели его продукции являются основными в оценке экологического состояния акваторий, что нашло отражение в нормативных документах России и других стран. Поэтому фитопланктон представляется одним из наилучших объектов биоиндикации в системе экологического мониторинга. Как уже было отмечено, традиционные биологические методы не удовлетворяют современным требованиям по точности, скорости получения информации и возможностям автоматизации системы мониторинга.

Современные технологии и методы экологического мониторинга, основанные на биоиндикации, должны быть:

1. объективными (являться методами инструментального контроля);
2. чувствительными (позволяющими обнаружить отклонения от нормы в реальных природных ситуациях);
3. в качестве критерия состояния должны использоваться наиболее важные общие параметры функционирования организмов;
4. универсальны в отношении вида воздействий, региона, типа экосистемы;
5. иметь возможности для полной или частичной автоматизации измерений;
6. позволять проведение обследований в пространстве и во времени.

7. быть пригодными для широкого использования.

Наиболее полно этим требованиям соответствует система мониторинга, основанная на оценки состояния пигментного и ФСА водорослей по параметрам флуоресценции ХЛ и спектрам поглощения фитопланктона. Фотосинтез является ключевым звеном сложной системы метаболизма, обеспечивающей рост и развитие растений и одноклеточных водорослей. В водных экосистемах начальным и ключевым звеном трофической цепи являются фитопланктонные одноклеточные микроорганизмы, продуктивность и обилие которых определяется эффективностью процессов фотосинтеза. Продуктивность фотосинтеза, определяющая первичную продукцию всей экосистемы, зависит от совокупности факторов среды, которые изменяют состояние ФСА. Неблагоприятные факторы, такие как дефицит минерального питания и токсические вещества различной природы снижают эффективность фотосинтеза и приводят к изменениям пигментного состава водорослей. Источником информации о состоянии ФСА служит ХЛ фотосинтетических мембран клеток фитопланктона. Определить функциональное состояние ФСА водорослей можно путем сопоставления интенсивностей флуоресценции ХЛ при возбуждении вспышками света разной интенсивности. Работами многих исследователей показано, что соотношение квантовых выходов флуоресценции ХЛ при различных интенсивностях возбуждающего света соответствует эффективности первичных процессов фотосинтеза. Измеренная таким образом эффективность первичных процессов фотосинтеза представляет собой безразмерную энергетическую характеристику фотосинтеза, аналогичную коэффициенту полезного действия и не зависящую от видовой специфики организма. Этот параметр имеет особенно большое значение для контроля загрязнения водной среды различными токсическими продуктами (ионами тяжелых металлов, фенолами, хлорорганическими соединениями, гербицидами, пестицидами, детергентами, легкими углеводородами и многими другими загрязняющими воду агентами), которые приводят к снижению эффективности фотосинтеза водорослей. Таким образом, измерение флуоресценции ХЛ при различных интенсивностях возбуждающего света позволяет регистрировать состояние ФСА природного фитопланктона в режиме реального времени без предварительной подготовки проб воды. Спектры поглощения фитопланктона, измеренные во внутренней полости интегрирующей сферы, позволяют также без предварительной подготовки воды определять пигментный состав, а некоторых условиях оценивать и таксономический состав планктонного сообщества.

В настоящее время разработаны и широко используются флуоресцентные методы оценки состояния фотосинтетического аппарата фитопланктона. Созданы приборы, позволяющие проводить измерения в пробах воды, в непрерывном потоке воды и зондировать толщу воды до глубины 200 м. Разработаны лидары (лазерные дистанционные флуорометры) для определения состояния фитопланктона при сканировании поверхностных вод с береговых вышек и с судов по их ходу. Эти методы позволяют с высокой точностью и за короткие времена проводить детальные обследования в точке или в малой (в пределах 1 мили) акватории. Лидарные методы также позволяют оценивать в воде содержание растворенных органических веществ и присутствие нефтепродуктов.

На обширных акваториях информация об обилии фитопланктона может быть получено со спутников из космоса. Для этого используют фотоснимки поверхности земли в разных областях спектра и по сопоставлению спектральной яркости (коэффициентам отражения) судят о спектральных свойствах объектов. Таким образом, по цветовым характеристикам воды удается определить содержание ХЛ в составе фитопланктона в верхнем слое вод. В настоящее время можно систематически получать карты распределения ХЛ любых акваторий. Такие съемки не способны давать информацию о функциональном состоянии фитопланктона. Они могут давать значительные ошибки в определении обилия фитопланктона из-за атмосферных помех, но в сочетании с несколькими опорными пунктами, на которых проводится определение содержания фитопланктона с высокой точностью (автоматическими станциями на платформах или буях), могут обеспечить получение чрезвычайно ценной информации о распределении фитопланктона на обширных акваториях. Кроме того, спутниковые снимки позволяют с высокой точностью определять температуру поверхностных вод и, за счет этого, оценивать направления и скорости перемещения водных масс. Автоматические станции на платформах или буях могут быть оснащены датчиками облученности (освещенности), температуры, скоростей водных потоков, солености, мутности, pH и концентрации ряда биогенных элементов.

Возможности определения первичной продукции фитопланктона по состоянию фотосинтетического аппарата

В настоящее время гидробиология не располагает безупречной методикой измерения первичной продукции в водной среде. Согласно современным данным общая чистая первичная продукция всего океана составляет около 60 млрд. тонн углерода за год, хотя разброс оценок, приводимых разными авторами, очень широк – от 35 до 100 млрд. тонн. Не вызывает сомнения необходимость совершенствования методов определения первичной продукции в водной среде.

Фотосинтетический аппарат водорослей обладает способностью к регуляции, которая обеспечивает сбалансированную работу всех компонентов ФСА. Из этого следует, что коэффициент фотосинтеза O_2/CO_2 (отношение выделенного кислорода к усвоенному углероду) остается постоянным в пределах 1,1-1,2. Для выделения одной молекулы O_2 требуется 8 квантов света, усвоенных фотосинтетическим аппаратом, а для синтеза углеводов (глюкозы) требуется 18 молекул АТФ и 12 молекул НАДФН.

Таким образом, валовая продукция может быть определена из количества квантов света, усвоенных ФСА. Следовательно, если определить количество квантов света, поглощенных фотосинтетическими пигментами, и эффективность их использования ФСА фитопланктона, то задача расчета первичной продукции и накопления биомассы будет решена.

Определять первичную продукцию в море можно комплексом спектральных методов по спектрам подводной облученности и параметрам флуоресценции хлорофилла. Измеряемая при этом эффективность утилизации квантов света в процессах фотосинтеза позволяет прогнозировать возможные изменения первичной продукции фитопланктонного сообщества в краткосрочной перспективе. Предлагаемый подход дает возможность проводить *in situ* измерение первичной продукции при помощи подводного зонда автоматически в режиме реального времени. Экспериментальное определение первичной продукции фитопланктона *in situ* может быть выполнено в непрерывном режиме в выбранном слое воды. Определять первичную продукцию в море можно комплексом спектральных методов по параметрам флуоресценции хлорофилла и спектрам подводной облученности. Первичная продукция измеряется по количеству усвоенных в фотосинтезе квантов света на единицу площади в выбранном слое воды. Она равна количеству поглощенных фотосинтетическим аппаратом водорослей квантов света умноженному на эффективность их утилизации в процессах фотосинтеза, которая определяется флуориметрическим методом.

Одним из главных источников ошибки в определении первичной продукции таким методом является то, что кванты света поглощенные ФС1 могут быть направлены не только в нециклический, но и в циклический транспорт электронов. Нециклический электронный транспорт через обе фотосистемы вызывает выделение O_2 и приводит к образованию восстановленных эквивалентов в виде НАДФН, тогда как циклический транспорт вокруг ФС1 не связан с выделением O_2 . Источником ошибки в определении первичной продукции может также стать процесс восстановления нитратов и сульфитов за счет восстановленных эквивалентов получаемых из ФСА. На включение нитратного азота в аминокислоту необходимо затратить 9 электронов из системы фотосинтетического транспорта электронов.

Совокупность перечисленных способов контроля дает возможность получения принципиально новой, углубленной информации об экологическом состоянии прибрежных вод. Таким образом, система экологического мониторинга обширных акваторий шельфа для определения текущего состояния прибрежных вод и надежного прогноза его изменения должна базироваться на принципах биоиндикации фитопланктона, быть многоуровневой.

10.3. Многоуровневая система экологического мониторинга прибрежных акваторий.

Многоуровневая система экологического мониторинга прибрежных акваторий должна включать в себя подсистемы, выполняющие следующие функции:

- анализ спутниковой информации (распределение хлорофилла, температура поверхности);
- сканирование нескольких локальных акваторий при помощи лидаров и передача результатов измерений в режиме реального времени в аналитический центр (эти измерения позволят оценить в приповерхностном слое обилие фитопланктона, эффективность его фотосинтеза, содержание органического вещества, количество взвесей и присутствие нефтепродуктов на поверхности воды);
- измерение распределения фитопланктона по глубине и оценка его состояния при помощи сети пунктов наблюдения, размещенных на буях, с возможностью передачи получаемой информации в режиме реального времени в аналитический центр (измерение на тех же буях скоростей водных потоков, температуры, солености, мутности и концентрации ряда биогенных элементов по глубине);
- проведение анализа всей совокупности получаемой информации аналитическим центром, который будет выдавать в режиме реального времени визуализируемую с помощью средств виртуальной реальности многослойную трехмерную карту состояния экосистемы обширных акваторий шельфа (МЗД-карта), а также сигнализировать о критических состояниях экосистемы;
- обеспечить возможность выхода патрульного катера в заданный район для прицельного отбора проб;
- проведение гидрохимического и гидробиологического анализа отобранных проб в береговой лаборатории с выдачей арбитражной информации о возможном загрязнении вод.

В результате использования многоуровневой системы экологического мониторинга прибрежных акваторий должны быть получены многослойные трехмерные карты. Разные слои этой карты будут соответствовать выбираемым оператором характеристикам экосистемы (направление и скорости потоков, температуру воды, ее соленость, обилие фитопланктона, эффективность его фотосинтеза, содержание органического вещества, количество взвесей, присутствие нефтепродуктов). Соответствующий программно-аппаратный комплекс будет обладать возможностями выделения различного рода объемных областей и зон в толще вод шельфа, вычисления оценок их характеристик (объема, массы, средней скорости, температуры, плотности планктона и т.д.), а также прогнозирования результатов протекающих в шельфовой зоне физических и биологических процессов.

В силу очевидной экономической и технической невозможности достаточно плотного покрытия подлежащей мониторингу зоны точками сбора данных, возникает необходимость применения специализированного математического аппарата, позволяющего экстраполировать результаты точечных наблюдений на весь объем контролируемой зоны шельфа. Основой такого аппарата будет комплекс методов алгебраического синтеза корректных алгоритмов, позволяющий в ситуациях отсутствия адекватных

математических моделей применять методы машинного обучения и интеллектуального анализа данных. Начальное обучение алгоритмов синтеза МЗД-карт будет проводиться на основе данных, получаемых на предварительном этапе работ в ходе проведения непрерывных долгосрочных (около года) измерений распределения фитопланктона по глубине и оценка его состояния в природных условиях с размещением измерительной аппаратуры на бусе. В качестве дополнительного результата анализа этих данных предполагается получить решение проблемы оптимизации количества и местоположения стационарных точек наблюдения на обширных прибрежных акваториях.

На первом этапе многоуровневая система экологического мониторинга прибрежных акваторий должен быть проведен фоновый мониторинг в условно чистых акваториях. Это необходимо для определения естественных вариаций состояния экосистемы не испытывающей прямой антропогенной нагрузки, а также для выяснения того, какие отклонения соответствуют нежелательному уровню. Параллельно исследованиям в природной среде необходимо исследовать изменения состояния фитопланктона в лабораторных условиях на аппаратуре, аналогичной устанавливаемой на бусе, при действии различных токсических веществ и других неблагоприятных воздействий. Частично эти работы уже выполнены, но они нуждаются в ряде существенных дополнений и уточнений.

В настоящее время разработаны и прошли испытания некоторые элементы, которые целесообразно было бы использовать в системе многоуровневого мониторинга.

Наиболее перспективным для оценки экологического состояния водоема и определения функциональной активности фитопланктона представляется использование комплекса физико-химических методов. Такой комплекс уже сейчас позволяет определять следующие показатели состояния фитопланктонного сообщества: обилие и эффективность работы ФСА фитопланктона по глубине «in situ» при помощи зонд-флуорометра; определять пигментный состав взвешенных в воде частиц и оценить таксономический состав фитопланктонного сообщества; определить количество растворимого органического вещества; детально исследовать регуляторные и адаптационные характеристики ФСА водорослей в пробах воды, извлеченной с определенных горизонтов; определять степень окислительного повреждения ФСА отфильтрованных клеток водорослей по показателям термохемилюминесценции; оценивать функциональное состояние и определять вклад определенных видов водорослей в продукционные характеристики фитопланктонного сообщества при помощи микрофлуорометра.

Флуоресцентное зондирование позволяет обследовать значительные акватории. Зондирование дает возможность определять содержание фотосинтетических пигментов и эффективности протекания первичных процессов фотосинтеза, измерять подводную облученность и температуру, а также рассчитывать продукционные характеристики фитопланктона по глубине в исследуемом водоеме. Кроме того, таким способом целесообразно проводить обследование в характерных точках гидродинамических структур, выбранных на основе анализа спутниковых данных. Во многих случаях измерения, проведенные при помощи зонда-флуорометра, вполне достаточны для получения данных о пространственном распределении и функциональном состоянии фитопланктонного сообщества. В стационарных условиях, как правило, горизонты с максимальным содержанием ХЛ имеют наибольшее значение переменной флуоресценции, так как высокая эффективность фотосинтеза приводит к наибольшему приросту численности и биомассы водорослей. В быстроменяющихся гидрофизических условиях возможно несоответствие эффективности фотосинтеза величине биомассы водорослей. Например, при подъеме из глубины к поверхности мало заселенной и богатой биогенными элементами водной массы наблюдается низкая биомасса фитопланктонных организмов при высоком значении эффективности утилизации света, что характерно для молодых быстро растущих популяций. В таких условиях происходит быстрое увеличение численности и биомассы фитопланктона. Напротив, обнаружение большой биомассы фитопланктона, обладающего малыми значениями относительной переменной флуоресценции, указывает на истощение ресурсов для увеличения численности и биомассы фитопланктонного сообщества. Таким образом, на основании анализа данных флуорометрических измерений может быть получена информация о фазах развития фитопланктонного сообщества.

Однако в природных условиях нередко возникают ситуации значительно усложняющие определение состояния планктонных водорослей. В ряде случаев выводы, основанные на результатах зондовых флуорометрических измерений, могут вступать в противоречия с данными гидрофизических и гидрохимических измерений. Часто в дневное время при интенсивной инсоляции водоросли распределенные в верхних горизонтах могут иметь низкое значение относительной переменной флуоресценции за счет фотоингибирования. В этих случаях определенное по интенсивности флуоресценции (F_0) значение содержания фотосинтетических пигментов может быть занижено за счет нефотохимического тушения возбужденных состояний ХЛ. Такое тушение может быть обусловлено как регуляцией состояния фотосинтетических мембран, так и фотоокислительным повреждением РЦ ФСА клеток водорослей.

При использовании зондового метода производится измерение среднего для всех видов фитопланктона значения эффективности фотосинтеза, тогда как одни из видов могут быть угнетены, а другие напротив иметь высокую активность ФСА. Это далеко не полный перечень причин усложняющих

определение состояния водного фитоценоза в природе. В сложных гидробиологических ситуациях необходимо значительно полнее, чем при зондировании водной толщи, характеризовать состояние ФСА фитопланктонного сообщества и индивидуальных видов водорослей на пробах воды, взятых с выбранных горизонтов.

Определение степени повреждения и обратимого фотоингибирования ФСА фитопланктона, происходящих в результате действия избыточных для водорослей интенсивностей света, возможно по изменению переменной флуоресценции в процессе адаптации в темноте. Исходно низкие значения относительной переменной флуоресценции в темноте или при слабом освещении могут существенно увеличиваться. Значения относительной переменной флуоресценции, а также скорость ее увеличения при перенесении объекта в темноту являются показателями глубины повреждения ФСА водорослей. Быстрое (за 1-2 ч) увеличение относительной переменной флуоресценции до значений порядка 0,5 и более характерно для обратимого фотоингибирования, в приповерхностных горизонтах вод низкого уровня трофности. Низкое (ниже 0,3) и неизменное при инкубировании в темноте значение относительной переменной флуоресценции соответствует глубоким необратимым процессам повреждения фитопланктона и является показателем деградации водного фитоценоза.

Выяснение условий обитания, к которым адаптирован ФСА водорослей, возможно по значениям нефотохимического тушения возбужденных состояний ХЛ под действием света определенной интенсивности. Таким образом, можно оценить, к каким световым условиям адаптированы водоросли. Эти данные могут представлять несомненный интерес для определения пространственно-временных адаптационных изменений состояния водного фитоценоза.

В подавляющем большинстве наших измерений интенсивность ТХЛ с глубиной зеркально соответствовала содержанию ХЛ. Из этого следует, что в благоприятных для развития фитопланктонного сообщества условиях процессы окислительного повреждения ФСА протекают на очень низком уровне. Высокий же уровень ТХЛ является показателем значительного окислительного повреждения ФСА фитопланктона и, соответственно, малой заселенностью горизонта. Исключения могут быть связаны с быстро меняющимися условиями среды, когда ответная реакция организмов не успевает реализоваться в численности клеток фитопланктона.

Выяснения вклада конкретных видов в продукционные характеристики фитопланктонного сообщества возможно при микрофлуорометрических исследованиях эффективности фотосинтеза индивидуальных видов водорослей на пробах воды, полученных после зондирования. Использование этого метода позволяет получить данные о содержании пигментов в индивидуальных клетках и функциональном состоянии ФСА массовых видов водорослей, а также составить краткосрочный прогноз динамики численности отдельных видов фитопланктона в данном фитоценозе. Следует отметить, что ранее в гидробиологии не было методов, позволяющих проводить такого рода исследования.

Таким образом, удастся практически одновременно для одних и тех же проб воды провести детальный анализ фитопланктонного сообщества и дать прогноз его развития. Высокая скорость измерения позволяет анализировать получаемую информацию непосредственно по ходу экспедиционных работ и вносить коррективы в планы исследования для более глубокого понимания функционирования водных экосистем. Представленные методики и флуорометрическая аппаратура при их комплексном использовании могут дать принципиально новую информацию о пространственно-временной изменчивости фитоценоза, а также служить составной частью системы экологического мониторинга состояния вод.

Флуориметрические методы и аппаратуры для экологического мониторинга водорослей и высших растений

Зонд – флуорометр. Изучение характеристик природного фитопланктона *in situ* предполагает необходимость зондовых измерений по всей глубине фотической зоны водоема, которая в океане может достигать 200 м. с высоким быстродействием при измерениях. Кроме того, устройство должно обладать высокой чувствительностью, так как минимальное содержание хлорофилла в природных водах (алиотрофные зоны океана) может составлять до 0,01 мкг/л.

На кафедре биофизики был создан зонд-флуорометр, способный работать до глубины 200 м, для измерения параметров флуоресценции (F_o , F_m и $(F_m - F_o)/F_m$) природного фитопланктона в естественных условиях с одновременной регистрацией температуры и подводной освещенности [57, 58, 59]. Прибор состоит из погружаемого прочного корпуса с оптикоэлектронной системой измерения, соединенной кабель-троссом с блоком питания и компьютером, управляющим процессом измерений по программе, задаваемой пользователем. Регистрирующая часть зонда состоит из фотоумножителя, усилителя сигналов, аналого-цифрового преобразователя, интерфейса связи с компьютером и двух независимых импульсных источников света с длительностью всплеск 0,01 мс (спектральная область 400-480 нм). Измерение всех параметров производится автоматически и результаты выводятся на экран компьютера в реальном времени по мере погружения аппарата в виде графиков, отражающих вертикальный профиль температуры, подводной освещенности, величин F_o и F_m в относительных единицах, показатель эффективности фотосинтеза водорослей $(F_m - F_o)/F_m$, а также концентрацию

хлорофилла *a* (объема фитопланктона), рассчитанную по величине F_0 в соответствии с калибровкой. На рис 5 приведена схема зондирования фитопланктона в море.

На рисунке 6 представлено одно из типичных распределений фитопланктона, когда наибольшее количество и фотосинтетическая активность клеток наблюдается на глубине градиентного по температуре слоя воды. В поверхностных слоях фотосинтез угнетается избыточными для фитопланктона интенсивностями солнечного света.

При помощи зонда-флуорометра были проведены обследования акваторий Черного, Каспийского, Балтийского и Японского морей, озёр Байкал и Иссык-Куль и других водоёмов. В качестве примера приведены некоторые результаты зондовых измерений, которые позволили построить распределения в верхнем перемешиваемом слое воды средних значений концентрации хлорофилла, и относительной переменной флуоресценции (рис. 6), а также распределения хлорофилла и относительной переменной флуоресценции по глубине (рис. 7).

Полученные данные иллюстрируют возможность использования погружного флуоресцентного зонда для определения скорости фотосинтеза фитопланктона по характеристикам первичных реакций фотосинтеза.

Эффективность ППФ, определенная как отношение F_v/F_m коррелирует со скоростью роста популяций клеток. Однако эта взаимосвязь между увеличением числа клеток и ослаблением F_v/F_m носит нелинейный характер, при котором не наблюдается роста популяции и увеличения числа клеток, когда величина квантового выхода ППФ F_v/F_m ниже 0,3 [66, 67]. Очевидно в этих условиях запасенной в ППФ энергии света хватает лишь на покрытие энергетических затрат клетки, но не достаточно для обеспечения ее активного роста и размножения. Эффективность фотосинтеза водорослей в естественных условиях не сохраняется постоянной, а меняется в разные периоды их развития, а также в течение суток в зависимости от условий освещения (утренние, дневные, вечерние часы). Это явление носит активный адаптационный характер в результате регуляторных изменений в фотосинтетическом аппарате в соответствии с физиологическим состоянием клетки. Так, на озере Байкал было обнаружено [60], что увеличение фотосинтетической активности и появление клеток с высоким показателем F_v/F_m наступает в декабре-феврале и предшествует периоду цветения водорослей (март), когда происходит резкое увеличение их числа. Аналогичное явление было обнаружено в водах северо-западного района Черного моря [61-62].

Интенсивность солнечной радиации оказывает влияние на активность ППФ, которая изменяется в течение суток. Это отражает хорошо известное явление полуденной депрессии фотосинтеза, которое сопровождается падением величины F_v/F_m . Характер уменьшения F_v/F_m в полуденные часы наибольшей освещенности зависит от степени обогащения водной среды элементами минерального питания. В обогащенных эвтрофных водах отношение F_v/F_m остается почти неизменным в течение дня даже в поверхностных слоях воды, где освещенность высокая (кривая б, рис.8) в основном вызвано уменьшением F_m вследствие ингибирования РЦ. В бедных олиготрофных водоемах более глубокое падение F_v/F_m в дневные часы (кривая в) связано также и с увеличением F_0 , которое как было показано выше, обусловлено обращением части электронного потока и генерацией флуоресценции в ФС2 в условиях голодания, что носит защитный характер, направленный против окислительного стресса.

Система ППФ, адаптируясь к различным внешним условиям, активно регулирует свое состояние таким образом, чтобы обеспечить оптимальное соотношение скоростей световых и темновых стадий для поддержания необходимого уровня фотосинтеза и клеточного метаболизма. Ключевую регуляторную роль здесь играет направленное изменение клеточной активности ФС2, что определяется сложным взаимодействием процессов фотодеструкции и репарации белков РЦ в зависимости от условий освещения и температуры, содержания элементов минерального питания в среде.

Помимо приведенных в настоящей статье методов измерения параметров флуоресценции хлорофилла, на кафедре разработаны также методы высокотемпературной термолюминесценции хлорофилла для определения степени инактивации фотосинтетических процессов фитопланктона в природных условиях [63]. Другой микроспектрофотометрический метод позволяет исследовать структуру фитопланктонного сообщества путем определения флуоресцентных показателей интенсивности фотосинтеза индивидуальных клеток массовых видов водорослей [61].

Кроме того, разработанные нами методы измерения флуоресценции хлорофилла были использованы для мониторинга состояния высших растений в зеленых насаждениях на нескольких улицах Москвы. Оказалось, что в неблагополучных районах величина F_v/F_m , измеренная для отдельных ветвей деревьев, и ее статистические параметры (отклонения от среднего) достоверно коррелируют со степенью загрязнения [64, 65].

Таким образом, показатели флуоресценции хлорофилла ассимиляционных тканей высших растений могут быть использованы для мониторинга их состояния и оценки благополучия среды обитания.

Перспективы использования флуоресцентных методов в экологическом мониторинге

На долю фитопланктона приходится почти половина фотосинтетической биологической продукции Земли. В морских экосистемах фитопланктон является главным источником органического вещества и фундаментом практически всех пищевых цепей. Поэтому обилие фитопланктона является

одним из необходимых показателей экологического состояния акваторий, что нашло отражение в нормативных документах России и других стран.

В 50-е годы прошлого века были разработаны спектрофотометрические методы определения хлорофилла в экстрактах органических растворителей. С тех пор мерой обилия водорослей было принято считать содержание в них хлорофилла *a*. Принципиальный недостаток такого подхода давно известен специалистам и неоднократно обсуждался. Хотя все водоросли содержат хлорофилл *a*, различные таксономические группы фитопланктона имеют значительно различающийся набор пигментов, ассоциированных в фотосинтетический аппарат. Соотношение между содержанием хлорофилла *a* и дополнительных фотосинтетических пигментов может варьировать в широких пределах у различных групп водорослей и зависит от условий обитания водорослей.

Анализ современных подходов к определению обилия фитопланктона и большой опыт российских и зарубежных исследований показывает, что наиболее оперативным и чувствительным для решения этой задачи являются измерения интенсивности флуоресценции хлорофилла водорослей в природной воде. Именно в последнее десятилетие и были разработаны и испытаны флуориметрические методы определения обилия фитопланктона.

Использование флуориметрического метода для определения хлорофилла в составе фитопланктонных водорослей не предполагает какой-либо предварительной подготовки воды для измерения. В современных приборах время измерения интенсивности флуоресценции не превосходит 5 секунд для самых бедных по содержанию фитопланктона вод. При помощи погружаемого зонда-флуорометра можно получить распределение хлорофилла по глубине, не извлекая на поверхность проб воды. Одновременное использование проточного флуорометра позволяет также проводить измерения содержания хлорофилла фитопланктона приповерхностных вод по ходу судна или вести непрерывный контроль этого показателя в течение длительного времени с платформы, буя или судна. Получаемая информация обрабатывается статистическими методами, запоминается в файлы и может быть передана по любым телекоммуникационным каналам в удобной для пользователя форме.

Таким образом, измерение интенсивности флуоресценции хлорофилла *a* позволяет надежно определить содержание хлорофилла *a* в составе водорослей природных вод, без обработки водных проб в режиме реального времени при автоматических измерениях. Это позволяет рекомендовать данный метод для включения в системы экологического мониторинга водной среды по содержанию в ней хлорофилла *a* в составе фитопланктона морских акваторий.

Эти же методы эффективны и для биоиндикации состояния водной среды обитания. Для контроля качества морской воды регламентирована программа (ГОСТ 17.1.3.08-82) определения ряда гидрохимических (8 обязательных и 6 дополнительных параметров в зависимости от акватории) и 14 гидробиологических показателей, в число которых входят концентрация хлорофилла и интенсивность фотосинтеза фитопланктона. Получение такой обширной информации для контроля качества морской воды с периодичностью проведения обследований до 2 раз в месяц чрезвычайно сложно реализовать и зачастую не является необходимым. Вместе с тем, наиболее рациональным и целесообразным представляется использование подходов, основанных на принципе биоиндикации. Они позволяют получить интегральную оценку экологического благополучия среды на основе измерения нескольких ключевых параметров состояния живых организмов. Естественным объектом биоиндикации в морской экосистеме являются сообщества фитопланктона, составляющие основу первичной продукции в море. Эффективность функционирования фотосинтетического аппарата представляется наиболее важным признаком для биоиндикации экологического благополучия и прогнозирования развития морского фитоценоза. Этот признак имеет особенно большое значение для контроля загрязнения водной среды различными токсическими продуктами (ионами тяжелых металлов, фенолами, хлорорганическими соединениями, гербицидами, пестицидами, детергентами, легкими углеводородами и многими другими загрязняющими воду агентами), которые приводят к снижению эффективности фотосинтеза водорослей.

Разработанный нами комплекс флуоресцентных методов позволяет определять обилие фитопланктона (содержание хлорофилла *a*) и эффективность работы фотосинтетического аппарата на разной глубине «*in situ*» при помощи зонд-флуорометра; определять те же показатели в поверхностных водах по ходу судна и на его стоянках при помощи проточного флуорометра; детально исследовать регуляторные и адаптационные характеристики ФСА водорослей в пробах воды, извлеченной с выбранных горизонтов; оценивать функциональное состояние и определять вклад определенных видов водорослей в продукционные характеристики фитопланктонного сообщества при помощи микрофлуорометра. В результате цикла работ на Черном, Балтийском и Каспийском морях, на Байкале, Иссык-Куле и других акваториях получены горизонтальные и вертикальные профили распределения фитопланктона и эффективности первичных процессов фотосинтеза в водной толще. Для ряда акваторий проведено также картирование распределения токсических веществ по состоянию фитопланктонных организмов.

Представленная методология и комплексное использование флуориметрической аппаратуры дают новую информацию о пространственно-временной изменчивости фитоценоза и могут также служить важной составной частью общей системы экологического мониторинга состояния вод. Особо следует отметить огромные перспективы использования данных флуориметрического анализа фитоценоза

локальных акваторий (в качестве опорных точек) в сочетании со спутниковой информацией о цветности вод.

В ряде стран (США, Германия, Англия и др.) результаты, полученные при помощи подобного рода флуорометрических методов определения обилия фитопланктона, входят в официальные отчеты по экологическому обследованию акваторий.

В настоящее время для проведения эффективного экологического мониторинга на территории Российской Федерации на основе разработанных флуоресцентных методов и аппаратуры необходима разработка нормативной базы и принятие соответствующих документов, регламентирующих их применение.

Литература к курсу «Экологическая биофизика»

А.А.Аверьянов

А.И.Арчаков, И.И.Карузина «Микросомальное окисление» Энциклопедия. Современное естествознание. М., Магистр-пресс. 2000 г. Т.8, с.261-267;

Г.А.Белякова, Ю.Т.Дьяков, К.Л.Тарасов «Ботаника» в 4 т. Т.2 –М., Издательский центр «Академия», 2006.- 320с.

В.Н.Бинги, А.В.Савин «Физические проблемы действия слабых магнитных полей на биологические системы». Успехи физических наук, 2003. т.173, с.265-300.

«Биологический контроль окружающей среды. Биоиндикация и биотестирование.» под ред. Мелеховой и Т.И., Сарапульцевой, М., «Академия», 2008. 288 стр.

Н. Г. Бухов Динамическая световая регуляция фотосинтеза. Физиология растений, Т. 51, N 6, 2004, стр. 825-837.

Ю.А.Владимиров и др. «Свободные радикалы в живых системах»; Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. 1991. Т.29.

Ю.А.Владимиров, А.Я.Потапенко «Физико-химические основы фотобиологических процессов» М.:Дрофа, - 285 с., 2006.

Ю.А.Владимиров, Е.В.Проскурина «Лекции по медицинской биофизике», М.,Изд-во МГУ; ИКЦ «Академкнига», 2007. -432 с.

Т.В.Веселова, В.А.Веселовский Д.С.Чернавский «Стресс у растений (Биофизический подход)». М. Изд-во Моск. ун-та. 1993. 144 с.

Е.Г.Говорунова, К.-Х.Джанг, О.А.Синецков «Фототаксис зеленых водорослей: новый класс родопсиновых рецепторов», Биофизика, Т.49, вып.2, 2004, с.278-293.

Н.И.Гольдштейн «Биофизические аспекты физиологического действия экзогенного O_2^- на животных» автореферат диссертации на соискание степени доктора биологических наук. М. 2000, 57 стр.

Н.И.Гольдштейн, Р.Н.Гольдштейн «Многоликий радикал, или новое в науке об аэроионах» Природа, 2009, №4, 28-35.

В.В.Добровольский «Основы биогеохимии» М. Издательский центр «Академия», 2003, 400 с.

В.М.Захаров, Д.М.Кларк «Биотест» М.1993, 68 с.

Ю.Н.Кауров, С.И.Погосян, А.С.Микозьян, Б.Возняк, Р.Хаптер «Опыт применения метода регистрации термохемилуминесценции хлорофилла для оценки функционального состояния сообществ фитопланктона (по результатам 23-го рейса НИС «Витязь»)», Физиология растений, т.43, №4, 1996, с. 629-637.

С.В.Климов «Пути адаптации растений к низким температурам», Успехи современной биологии, 2001, том 121, № 1, с. 3-22.

Р.Клинтон «Фотосинтез. Физические механизмы и химические модели», М., Мир, 1984.-350 с.

С.В. Котелевцев

А.А.Красновский мл. «Фотодинамическое действие и синглетный кислород», Биорфизика, 2004, том 49, вып.2, с.305-321.

А.А.Красновский мл. «Фотодинамическая регуляция биологических процессов:первичные механизмы» Проблемы регуляции в биологических системах. Биофизические аспекты. Под ред. А.Б.Рубина. Ижевск. стр.223-254.

Ю.Б.Кудряшов, Ю.Ф.Перов, А.Б.Рубин «Радиационная биофизика: радиочастотные и микроволновые электромагнитные излучения» - М.: Физматлит, 2008. – 184 с.

Ю.Б.Кудряшов, А.Б.Рубин, «Радиационная биофизика: сверхнизкочастотные электромагнитные излучения» - М.: Физматлит. 2014. – 216 с.

Кукушкин А.К., Тихонов А.Н. Лекции по биофизике фотосинтеза (1988) М.: МГУ, 320с.

Ю.И.Куклев «Физическая экология», М., «Высшая школа», 2001. - 357 с.

О.Н.Кулаева «Белки теплового шока и устойчивость растений к стрессу» СОЖ, 1997. №2.

А.П.Левич, В.Н.Максимов, Н.Г.Булгаков «Теоретическая и экспериментальная экология фитопланктона. Управление структурой и функциями сообществ», М.: Изд-во НИЛ, 1997. 184 с.

А.П.Левич «Искусство и метод моделирования систем». : М.-Ижевск.2012.- 728 с.

Н.П. Масюк, Ю.И. Посудин, Г.Г. Лилицкая «Фотодвижение клеток *Dunaliella Teod.* (*Dunaliellales*, *Chlorophyceae*, *Viridiplantae*)». : Киев. 2007. – 264 с.

В.С.Мартынюк, Н.А.Темурьянц, Б.М.Владимирский «У природы нет плохой погоды: космическая погода в нашей жизни», Киев, 2008. – 212 с.

Маторин Д.Н., Венедиктов П.С. Люминесценция хлорофилла в культурах микроводорослей и природных популяциях фитопланктона.//Итоги науки и техники. Т.40. Биофизика. М. 1990. стр. 49-100.

М.Н.Мерзляк

Ю.Одум «Экология» М., «Мир», 1986, Т.2, 376 с.

Погосян С.И. Состояние растительных организмов в природных условиях и окислительное повреждение фотосинтетического аппарата.// автореф. Докторской диссерт. М. 2003. 56 стр.

Печуркин, 1990

О.Г.Полесская «Растительная клетка и активные формы кислорода» М. КДУ, 2007. – 140 с

У.Г.Рис «Основы дистанционного зондирования» М.; Техносфера, 2006. 336 с.

Рубин А.Б. Биофизика. Т.2. М.: Книжный дом «Университет», 2000. 468с.

Рубин А. Б. Принципы организации и регуляции первичных процессов фотосинтеза. Тимирязевские чтения LV. Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН, 1995, 38 С.

Рубин А.Б., Кренделева Т.Е. Регуляция первичных процессов фотосинтеза. // Биофизика. Т. 49. вып. 2. 2004. стр.239-253.

Г.Селье «Стресс без дистресса». — М: Прогресс, 1979. — 123 с.

Г.Селье «Очерки об адаптационном синдроме», М., Медгиз, 1960. -255 с.

А.Е.Соловченко, М.Н.Мерзляк «Оптическое экранирование как фотозащитный механизм растений» -М.: А-Литера, 2010, - 164 с.

И.А.Торчевский «Метаболизм растений при стрессе» Казань, «Фен», , 2001. – 448 с.

И.А.Тарчевский «Метаболизм растений при стрессе», Изд-во «Фэн», Казань 2001. - 448 с.

Тихонов А.Н. Молекулярные преобразователи энергии в живой клетке. Соросовский образовательный журнал. N7, 1997. стр. 10 – 17.

А.Н.Теренин «Фотоника молекул красителей», Л. Наука,1967.

Тихонов А.Н. «Регуляция световых и темновых стадий фотосинтеза» СОЖ, 1999, №11, с. 8-15.

П.Хочачка, Дж. Сомеро «Биохимическая адаптация» М. «Мир», 1988. - 568 с.

Т.В.Чиркова «Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям» СОЖ, №9, 1997, с. 12-17);

Г.Я. Фрайкин, М.Г. Страховская, А.Б. Рубин «Биологические фоторецепторы светозависимых регуляторных процессов», Биохимия, 2013, т.78, №11, с. 1576-1594.

П.В.Фурсова и др. «Лимитирующие ресурсы и состав сообщества бактерий: эксперименты и модельный анализ» М., ГЕОС, 2008, 162 с.

Дж.Харборн «Введение в экологическую биохимию» М., «Мир», 1985, 312 с.

У.Хебер, О.Л.Ланге, В.А.Шувалов «Запасание и диссипация энергии света растениями как взаимодополняющие процессы, вовлеченные в поддержание жизни растения». Проблемы регуляции в биологических системах. Биофизические аспекты. Под ред. А.Б.Рубина. Ижевск. стр.195-222.

К.С.Шифрин «Введение в оптику океана», Л. «Гидрометиздат», 1983, -278 с.

С.Э.Шноль и др. «Зависимость «Макроскопических флуктуаций» от географических координат по материалам Арктической (2000 г.) и Антарктической (2001 г.) экспедиций», Биофизика, 2003, Т.48, вып. 6, с. 1123-1131).

С.Э.Шноль и др. «Зависимость «Макроскопических флуктуаций» от космофизических факторов. Пространственная анизотропия», Биофизика, 2004, Т.49, вып. 1, с. 132-139.

С.Э.Шноль «Биологические часы (краткий обзор хода исследований и современного состояния проблемы биологических часов) СОЖ №7, 1996.

В.А.Шувалов «Преобразование солнечной энергии в первичном акте разделения зарядов в реакционных центрах фотосинтеза» Тимирязевские чтения, LX, М.,Наука, 2000.-50с.

Т.Эдмондсон (W.T.Edmondson) «Практика экологии. Об озере Вашингтон и не только о нем» / Пер. с англ. Н.О.Фоминой; Под ред. А.М.Гилярова. М.: Мир, 1998. 299 с.

L.R.Brown, W.W.Norton “Plan B 3.0: Mobilizing to save civilization” Earth Policy Institute. 2008. Адрес в Интернете: www.earthpolicy.org/Books/PB3