

О МЕХАНИЗМЕ БИФОТОННОГО ВОЗБУЖДЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ МОЛЕКУЛ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА ПУРПУРНЫХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ МОЩНЫМИ ФЕМТО-ПИКОСЕКУНДНЫМИ ИМПУЛЬСАМИ БЛИЖНЕГО ИК-ДИАПАЗОНА

*А. Ю. Борисов**

*Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
119991, Москва, Россия*

Поступила в редакцию 21 декабря 2009 г.
после переработки 17 июня 2011 г.

В серии экспериментальных работ было наблюдеено нерезонансное бифотонное возбуждение фемтосекундными ИК-импульсами (1250–1500 нм) молекул бактериохлорофилла, основного пигмента в составе поглощающих свет естественных «антенных» комплексов фотосинтезирующих пурпурных бактерий. Авторы этих работ считают, что ИК-кванты возбуждали гипотетические запрещенные уровни пигментов этих бактерий в районе удвоенных частот 625–750 нм. Нами предложен и обоснован альтернативный триплетный механизм, который, по-видимому, ответственен за это явление. Согласно нашей гипотезе, механизм бифотонного возбуждения молекул ИК-квантами может специфично проявляться через высокие триплетные уровни молекул в мощных полях, которые реализуются в импульсах фемто-пикосекундных лазеров.

Преобразующие свет фотоэлектрохимические аппараты фотосинтезирующих организмов располагаются внутри клеток в тонких порядка 40 Å, белково-липидных мембранах. У пурпурных бактерий основными поглощающими свет пигментами являются бактериохлорофиллы (БХл) и каротиноиды (КР). Структура их основных комплексов LH1 (light-harvesting-1) организована трансмембранными фрагментами α/β -белков в правильные круги с диаметром 110 Å, которые окружают так называемые реакционные центры [1]. С этими белками ассоциирована основная масса «антенных», т. е. поглощающих свет, молекул БХл, которые в литературе обозначаются как B875 (здесь и далее цифры при буквах обозначают положение длинноволнового пика абсорбции у соответствующих спектральных фракций БХл). У большинства пурпурных бактерий также имеются комплексы LH2, которые при слабой освещенности поставляют на LH1 дополнительные количества синглетных возбужденных состоя-

ний [1, 2]. Они также образуют круговые структуры на основе α/β -белков, с которыми ассоциируются более коротковолновые фракции молекул БХл, B800 и B850. Эти «антенны» пурпурных бактерий также содержат молекулы КР, которые расположены в непосредственной близости от молекул БХл и имеют сильные полосы поглощения в диапазоне 420–540 нм. Продуцируемые светом синглетные возбужденные состояния мигрируют в комплексах LH2 от КР на B800, B850 и B875, далее на B875 комплексов LH1 и от последних на димеры БХл энергообразующих реакционных центров.

В работах [3, 4] выделенные из двух пурпурных бактерий интактные мембранные фрагменты LH2 облучались фемтосекундными ИК-импульсами с длинами волн в диапазоне 1260–1480 нм. При этом наблюдалось люминесцентное свечение спектральной фракции антенного БХл, B850. Сходные опыты были проведены с растительными препаратами [5, 6]. Эти эффекты квадратично зависели от энергии импульсов. Авторы работ [3, 4] заключили, что суммирование энергий пар ИК-квантов позво-

*E-mail: borissov@belozersky.msu.ru

ляет заселять некий запрещенный уровень КР в области около 670 нм, где спектры пурпурных бактерий имеют крайне малую абсорбцию. По мнению авторов работ [3, 4], из этого возбужденного состояния КР в ЛН2 происходила быстрая миграция синглетных возбужденных состояний на спектральную фракцию БХл, В850.

Позднее были опубликованы работы [7, 8], в которых сходные эксперименты были поставлены на аналогичных препаратах ЛН2, выделенных из клеток дикого штамма пурпурной бактерии *Chromatium minutissimum* и из ее клеток, у которых синтез КР был подавлен. У обоих препаратов наблюдались сходные по амплитуде и спектру люминесцентные свечения В850, хотя у ЛН2 из бескаротиноидного препарата доля КР составляла не более 5% от таковой в диком штамме. На этом основании авторы [7, 8] заключили, что молекулы КР не участвовали в передаче энергии на молекулы БХл В850. Они также предположили, что у комплексов ЛН2 имеется запрещенная полоса в области около 700 нм, которая может функционировать лишь при двухфотонном возбуждении, однако в отличие от выводов в [3, 4], в работе [8] эта гипотетическая полоса была приписана «круговым ассоциатам» молекул В850. Тем не менее, некоторые из авторов [3, 4] опубликовали новые работы, в которых они по-прежнему настаивают на механизме фотовозбуждения молекул В850 через запрещенную полосу абсорбции каротиноидов [9, 10].

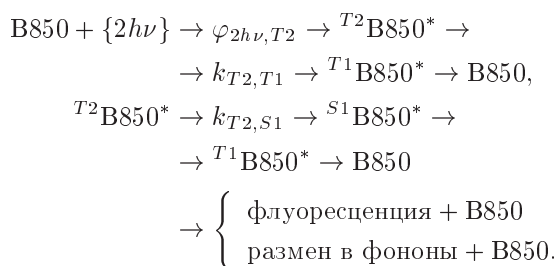
Кроме молекул БХл и КР в препаратах ЛН2 присутствуют белки, вода, примеси липидов и некоторые количества ионов. Длинноволновые полосы абсорбции белков и липидов находятся в диапазоне короче 320 нм, что никак не согласуется с квадратичной зависимостью наблюдаемого эффекта, вызываемого фемтосекундными импульсами в диапазоне 1200–1500 нм. Остаются каротиноиды и присутствующие в препаратах спектральные фракции БХл. В принципе авторы всех перечисленных выше работ находятся на сходных позициях: все они считают ответственным за возбуждение флуоресценции БХл В850 поглощение ИК-квантов в некоей гипотетической запрещенной полосе абсорбции либо у КР [3, 4, 9, 10], либо у БХл В850 [7, 8, 11], из которой синглетные возбужденные состояния мигрируют на молекулы В850.

По нашему мнению, результаты работ [3, 4, 7–11] можно объяснить иначе в рамках представлений современной молекулярной оптики.

Следует напомнить, что запреты на интеркомбинационные переходы типа $S \rightarrow T$ и $T \rightarrow S$ (S и T обозначают синглетный и триплетный уровни молекул)

не носят абсолютного характера. Например, у многих молекул красителей переходы $S_1^* \rightarrow T_1^*$ эффективно конкурируют с разрешенными переходами $S_1^* \rightarrow S_0$. Также известно, что сила интеркомбинационных запретов резко убывает, если молекулы оказываются в электрических полях, которые возмущают их орбитали. Так, в растворах в присутствии миллимолярных концентраций ионов йода и некоторых других тяжелых ионов сила синглет-триплетного запрета может уменьшаться вплоть до 2–2.5 порядков. В классических исследованиях [12, 13] и в ряде последующих работ в присутствии ионов йода и других тяжелых элементов на обычных спектрофотометрах были непосредственно зарегистрированы полосы поглощения, соответствующие $S_0 \rightarrow T_1^*$ переходам в возбужденное триплетное состояние для ряда молекул красителей.

По нашему мнению, подобное явление должно было присутствовать в опытах [3, 4, 7–11], в которых во время прохождения лазерных импульсов напряженность индуцированных ими в биопрепаратах полей достигала 10^6 В/см. Пары фемтосекундных ИК-квантов (либо их вторая гармоника, которая неизбежно должна генерироваться мощными фемтосекундными импульсами) должны возбуждать относящийся к синглетной полосе S_2^* (у В850 при 595 нм) второй триплетный уровень T_2^* молекул В850. Из него в силу небольшой разницы энергий должно происходить заселение первого (S_1^*) синглетно-возбужденного состояния этих молекул, сопровождающееся флуоресценцией В850. Схема последовательных процессов поглощения ИК-квантов и последующей конверсии вызванных ими электронных возбуждений в молекулах БХл В850 комплексов ЛН2 пурпурных бактерий имеет следующий вид:



Здесь $\{2h\nu\}$ может означать как два перекрывающихся ИК-кванта, так и вторую гармонику $\{h2\nu\}$, которая генерируется в нелинейной среде при воздействии мощных лазерных фемтосекундных импульсов; $\varphi_{2h\nu, T_2}$ — квантовый выход нелинейного поглощения $\{2h\nu\}$ или $\{h2\nu\}$ в поле ИК-импульсов молекулами В850 в образце; k_{T_1, S_1} — константа триплет-синглетной конверсии молекул В850 из триплет-

ного состояния $T2$ в первое синглетно-возбужденное состояние $S1$.

Учитывая, что у молекул В850 пик поглощения полосы второго синглетно-возбужденного состояния S^2B850^* расположен около 590 нм, можно предположить, что полоса ее триплетного состояния T^2B850^* находится в диапазоне эффекта (620–740 нм), который наблюдался в работах [3, 4, 7–11]. Данных о положении уровня T^2B850^* в литературе не нашлось, однако для такого утверждения имеются основания. В работах [14, 15] положения первых триплетных уровней (T_1^*) были впервые зарегистрированы по спектрам фосфоресценции соответственно для хлорофилла и бактериохлорофилла в модельных и естественных препаратах. В работе [14] по этим спектрам для БХл-белковых комплексов из пурпурных бактерий *Rps. viridis* и *Rb. sphaeroides* были определены разности энергий $\Delta W = S_1^* - T_1^* \approx 3200 \text{ см}^{-1}$. Можно ожидать, что переворотам спина из синглетных состояний S_1^* и S_2^* соответствуют сходные величины потерь электронной энергии. При таком допущении у фракции БХл В850 полоса поглощения уровня T_2^* оказывается в спектральном диапазоне, в котором наблюдалась бифотонная абсорбция в работах [3, 4, 7–11].

Проведем количественный расчет. Из работы [11] были заимствованы следующие данные: энергия фемтосекундного импульса $W_{imp} = 10^{-4}$ мДж, частота генерации импульсов $\Omega' = 10^3 \text{ с}^{-1}$, светосила канала регистрации флуоресценции около 1 : 4, ослабление светового потока в режиме регистрации спектров флуоресценции на отдельных длинах волн $Sp \approx 1/70$. Для молекул В850 имеем $\varphi_{fl} = 0.042$. Сигналы флуоресценции регистрировались с помощью матрицы-1 Дельтатех 4М16U (Научный парк МГУ), ее характеристики: при 860 нм квантовый выход фотоэлектронов равен 0.032, чувствительность такова, что при 130 фотоэлектронах отношение сигнал/шум равно 1.

Количество фотонов флуоресценции, достигающих фотоприемник за время накопления сигнала [8] (3 с, 5 повторов), можно оценить по формуле

$$\begin{aligned} N_{fl} &= [W_{imp}\Omega' \cdot 15/(2hc/\lambda)] \varphi_{2h\nu, T2} (k_{T2, S1}/k_{T2, T1}) \times \\ &\quad \times \varphi_{fl} (1/16\pi) P_{h\nu} Sp \approx \\ &\approx (10^{-7} \cdot 10^{19} \cdot 15 \cdot 10^3 / 2 \cdot 1.6 \cdot 0.95) \times \\ &\times \varphi_{2h\nu, T2} (k_{T2, S1}/k_{T2, T1}) 42 \cdot 10^{-3} (2 \cdot 10^{-2}) 0.25 \cdot 70^{-1} \approx \\ &\approx 3 \cdot 10^8 \varphi_{2h\nu, T2} (k_{T2, S1}/k_{T2, T1}), \quad (1) \end{aligned}$$

где hc/λ — средняя энергия лазерных ИК-квантов, равная 0.95 эВ; $\Omega' = 10^3$; $[W_{imp}\Omega' \cdot 15/(2hc/\lambda)]$ — количество пар ИК-квантов $\{2h\nu\}$, поступающих на образец за 15 с в процессе регистрации одной точки спектра флуоресцентного свечения; $\varphi_{2h\nu, T2}$ — квантовый выход конверсии пар ИК-квантов $\{2h\nu\}$ в энергию триплетного $T2$ -состояния молекул В850; φ_{fl} — квантовый выход флуоресценции В850, равный $4 \cdot 10^{-2}$; $1/16\pi \approx 2 \cdot 10^{-2}$ — доля квантов флуоресценции, собираемых оптической системой со светосилой 1 : 4; Sp — средняя доля фотонов, проходящая через спектрограф при регистрации на отдельных длинах волн ($\approx 1/70$).

По аналогии с переходами $S2 \rightarrow S1$ (спин сохраняется, разность энергий невелика) скорость конверсии $T2 \approx k_{T2, T1} \approx T1$ может достигать 10^{12} с^{-1} . По аналогии с $S \rightarrow T$ -переходами у хлорофиллов значение константы $k_{T2, S1}$ должно быть в пределах $(3-6) \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$, поскольку у В850 разность энергий уровней $T2$ и $S1$ также невелика. Отсюда следует, что

$$\frac{k_{T2, S1}}{k_{T2, T1}} \approx (3-6) \cdot 10^{-4}.$$

Подставив это значение в формулу (1) получим

$$N_{fl} \approx 3 \cdot 10^8 \varphi_{2h\nu, T2} \cdot 10^{-3} \approx (1-2) \cdot 10^5 \varphi_{2h\nu, T2}. \quad (2)$$

В соответствии с приведенными выше характеристиками системы регистрации, при 130 фотоэлектронах сигнала отношение сигнал/шум равно 1. В спектре флуоресценции на рис. 3 в работе [8] отношение сигнал/шум равно 7–9. Следовательно, при регистрации отдельных точек в области максимума флуоресценции числа фотоэлектронов были равны $N_{phe} = 130 \cdot 8^2 \approx 8 \cdot 10^3$. С учетом величины квантового выхода фотокатода регистрирующей матрицы-1 Дельтатех 4М16U, равного 0.04, соответствующее число фотонов флуоресценции равнялось $N_{fl} \approx 10^5$.

Эта грубая оценка соответствует расчетным данным, полученным с помощью формулы (2). Она означает, что если предложенный механизм возбуждения молекул БХл мощными фемтосекундными импульсами верен, то, согласно этой оценке, квантовый выход конверсии пар ИК-квантов во второе триплетное состояние этих молекул должен не сильно отличаться от единицы.

Тот факт, что ширина спектра действия возбуждения флуоресценции В850 в экспериментах [3, 4, 7–11] в 3–4 раза превышает ширины спектров абсорбции молекул В850 (здесь также присутствует уширение спектра в соответствии с принципом Гейзенберга) весьма характерен для триплетного поглощения.

Если предложенная гипотеза верна, то в лазерной физике возникает новое направление исследований: прямое возбуждение триплетных уровней молекул или по крайней мере их ассоциатов, как это имело место в работах [3, 4, 7–11], мощными фемтопико-секундными импульсами. Также представляется интересным выяснить, что вызывает активные стимуляции синглет-триплетных и триплет-синглетных переходов — высокие значения электрических полей или их резкие скачки на переднем и заднем фронтах фемтосекундных импульсов.

Из дискуссии с рецензентом этой работы возник дуализм в подходе к механизму описанного явления: стимуляции переворотов спинов, которая сильно увеличила эффективность синглет-триплетных и триплет-синглетных переходов могла быть вызвана как магнитной составляющей световых волн, так и непосредственно их электрической составляющей через эффект Штарка. Для решения возникших физических проблем, по-видимому, нужны прецизионные поляризационные эксперименты, в которых векторная составляющая полезного эффекта будет сопоставлена с векторами электрических и магнитных полей мощных лазерных импульсов.

Автор благодарен А. П. Разживину за предоставление оттиска работы [8] до ее выхода в печать и за подробное обсуждение деталей экспериментов, проведенных в его лаборатории.

ЛИТЕРАТУРА

1. B. Robert, R. J. Cogdell, and R. van Grondelle, in: *Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis*, ed. by B. W. Green and W. W. Parson. Amsterdam (2003), p. 169.
2. R. J. Cogdell, N. Isaaks, A. Freer, T. D. Howard, A. Gardiner, S. M. Prince, and M. Papiz, *FEBS Lett.* **555**, 35 (2003).
3. B. P. Krueger, G. D. Scholes, R. Jimenez, and G. R. Fleming, *Phys. Chem. B* **102**, 2284 (1998).
4. P. J. Walla, P. A. Linden, C. P. Hsu, G. D. Scholes, and G. R. Fleming, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **97**, 10808 (2002).
5. A. P. Shreve, J. K. Trautman, T. G. Owens, and A. C. Albrecht, *Chem. Phys. Lett.* **102**, 170 (1990).
6. P. J. Walla, P. A. Linden, K. Ohia, and G. R. Fleming, *J. Phys. Chem.* **106**, 1909 (2002).
7. М. А. Крикунова, Д. Леупольд, М. Рини, Б. Фогт, А. А. Москаленко, О. А. Торопыгина, А. П. Разживин, *Биофизика* **48**, 1015 (2003).
8. И. А. Степаненко, В. О. Компанец, С. В. Чекалин, З. К. Махнева, А. А. Москаленко, А. П. Разживин, *Биол. мембраны.* **26**(2), 1 (2009).
9. T. Polivka, D. Zigmantas, J. L. Herek, Z. He, T. Pascher, T. Pullerits, R. J. Cogdell, H. A. Frank, and V. Sundstrom, *J. Phys. Chem. B* **106**, 11016 (2002).
10. A. Wehling and P. J. Walla, *Photosynth. Res.* **90**(2), 101 (2006).
11. I. Stepanenko, V. Kompaneets, Z. Makhneva, S. Chekalin, A. Moskalenko, and A. P. Razjivin, *J. Phys. Chem. B* **113**, 11720 (2009).
12. D. S. J. McClure, *J. Phys. Chem.* **17**, 905 (1959).
13. M. Kasha, *Disc. Faraday Soc.* **9**, 14 (1960).
14. A. A. Krasnovsky and A. N. Semenova, *Photobiochem. Photobiophys.* **3**, 11 (1981).
15. L. Takiff and S. G. Boxer, *J. Amer. Chem. Soc.* **110**, 425 (1988).