

PACS numbers: 82.20.-w, 82.39.Jn, 82.50.Hp, 87.14.ep, 87.15.hp, 87.15.ht, 87.15.M-

## **Кінетична модель донор-акцепторної взаємодії у фотосинтетичних реакційних центрах бактерій**

Т. В. Серденко, Ю. М. Барабаш, П. П. Нокс\*, Н. Х. Сейфулліна\*,  
М. А. Заболотний\*\*

*Інститут фізики НАН України,  
просп. Науки, 46,  
03028 Київ, Україна*

*\*Московський державний університет імені М. В. Ломоносова,  
Ленінські гори, 1,  
119991 Москва, Росія*

*\*\*Київський національний університет імені Тараса Шевченка,  
просп. Акад. Глушкова, 2,  
03022 Київ, Україна*

Виконано аналіз взаємодії фотостимульованих структурних змін у процесі електронного транспорту в пурпурових бактеріях *Rhodobacter sphaeroides*. Використовуючи методи динамічної спектроскопії видимого світла, досліджувалася кінетика поглинання водних розчинів реакційних центрів за різних режимів фотозбудження. Запропоновано систему з трьох балансних рівнянь з рівнянням стану. Розв'язуючи обернену задачу, одержано значення мікрошвидкостей кінетичних рівнянь, що характеризують дворівневу систему у вигляді чотирьох електрон-конформаційних станів. Одержано залежності мікрошвидкостей для різних часів та інтенсивностей збуджувального світла. Зроблено припущення, що в процесі окиснення беруть участь два механізми структурних змін. Завдяки одному з них, швидкість повернення електрона збільшується, завдяки іншому — зменшується. У процесі віднови визначальним є другий механізм. Встановлено, що в процесі освітлення реакційних центрів структурні зміни відбуваються, а після вимкнення світла — ні.

Photoinduced structural changes in the process of electron transport in the purple bacteria of *Rhodobacter sphaeroides* are analysed. Using the methods of dynamic spectroscopy of visible light, the kinetics of absorption of aqueous solutions of reaction centres in different modes of photoexcitation is studied. The set of three balance equations with state equation is suggested. Values of microrates in kinetic equations are obtained. Two-level system can be described as the system with four electron-conformational states. Dependences of microrates for different times and intensities of the exciting light are ob-

tained. As suggested, the oxidation process involves two mechanisms of structural change. Due to one of the processes, returning electron velocity increases; due to another one, it decreases. The recovery process is determined by the second mechanism. As found, the structural changes occur when reaction centres are lighted on, and these changes do not take place, when the light is turned off.

Выполнен анализ взаимодействия фотостимулированных структурных изменений в процессе электронного транспорта в пурпурных бактериях *Rhodobacter sphaeroides*. Используя методы динамической спектроскопии видимого света, исследовалась кинетика поглощения водных растворов реакционных центров при различных режимах фотовозбуждения. Предложена система из трёх балансных уравнений с уравнением состояния. Решая обратную задачу, получены значения микроскоростей кинетических уравнений, которые характеризуют двухуровневую систему в виде четырёх электрон-конформационных состояний. Получены зависимости микроскоростей для различных времён и интенсивностей возбуждающего света. Сделано предположение, что в процессе окисления действуют два механизма структурных изменений. Согласно одному — скорость возврата электрона увеличивается, согласно другому — уменьшается. В процессе восстановления определяющим является второй механизм. Установлено, что в процессе освещения реакционных центров структурные изменения происходят, а после выключения света — нет.

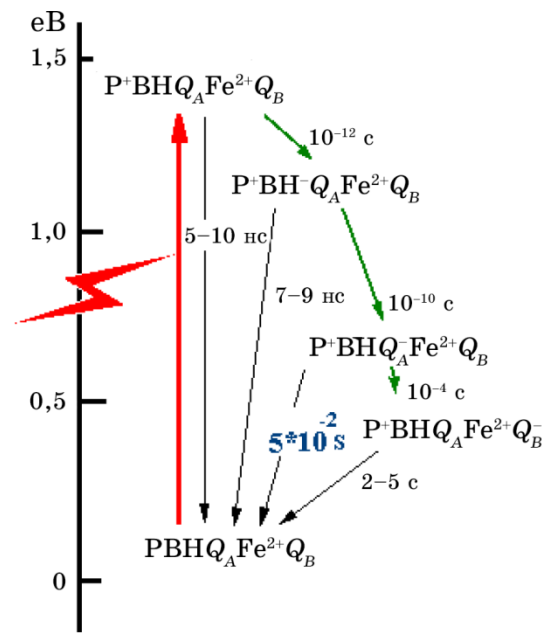
**Ключові слова:** реакційний центр, пурпурові бактерії, фотостимульований електронний транспорт, двохуровнева кінетична модель, електрон-конформаційні стани біологічних макромолекул.

*(Отримано 2 грудня 2013 р.)*

## 1. ВСТУП

Мембранні білково-пігментні комплекси фотосинтетичних реакційних центрів (РЦ) є унікальними природними макромолекулярними системами для вивчення фізичних механізмів транспорту електронів та протонів у біологічних структурах, для вивчення ролі молекулярної динаміки у вискоєфективних процесах перенесення зарядів та їх регуляції. Вивчення функціональних даних макромолекулярних систем дозволяє одержати цінну інформацію для аналізу внутрішньобілкового перенесення зарядів між інтегрованими в структуру білка кофакторами. На фотосинтетичних РЦ бактеріального типу було вперше показано можливість ефективною конформаційною регуляцією спрямованого перенесення електронів у первинних процесах фотосинтезу, роль молекулярної динаміки в цій регуляції [1–3].

Послідовність і часи перенесення електрона в структурі РЦ пурпурових бактерій *Rhodobacter sphaeroides* після одноразового збу-



**Рис. 1.** Енергетична схема фоторозділення і переносу заряду в РЦ виду *Rb. Sphaeroides*. Константи характерних часів перебування електрона на кофакторах дано за кімнатної температури.

дження РЦ коротким спалахом світла показано на рис. 1.

Основна задача РЦ — переносити фотозбуджені електрони на інший бік мембрани, і, тим самим, створювати той електричний потенціал, на якому працює фотосинтез. До складу РЦ входять наступні кофактори: чотири бактеріохлорофіли (P, B), два бактеріофеофітини (H), два хінони ( $Q_A$  і  $Q_B$ ) і один високоспіновий атом заліза ( $Fe^{2+}$ ). Фотосинтетичний РЦ має три мембранні субодиниці: *L*, *M* та *H*, молекулярні маси яких складають 19, 22 та  $28 \cdot 10^3$  — легка, середня і важка відповідно. Субодиниці *L* і *M* дуже подібні. Усі трансмембранні частини —  $\alpha$ -спіралі.

Спочатку квант світла вибиває електрон з димеру бактеріохлорофілу (P), що є донором електронів. Цей електрон менш ніж за  $10^{-12}$  с переходить на феофітин, долаючи при цьому відстань  $\sim 3 \text{ \AA}$ . На кожному з кофакторів ланцюга переносу електрона його стабілізація викликана структурно-динамічною організацією молекулярного комплексу РЦ. Досі точно невідомо щодо ролі мономеру бактеріохлорофілу. Є два альтернативних механізми: 1) послідовний механізм використання  $B_A$  як реального проміжного акцептора і 2) так званий суперзміненний механізм, коли  $B_A$  забезпечує лише віртуальний стан для електронного транспорту. Проте електрон на ньому не локалізується і переходить з димеру бактеріохлорофілу

прямо на молекулу бактеріофеофітину, що відіграє роль проміжного акцептора [4]. Потім, за  $\sim 10^{-10}$  с, з феофітину  $H_A$  електрон переходить на хінон  $Q_A$ , при цьому швидкість цього переходу не залежить від температури. Далі відбувається перехід електрона за  $\sim 10^{-4}$  с на хінон  $Q_B$  — вторинний акцептор [5]. При цьому електрон долає загальну відстань  $\sim 40$  Å. У випадку ізольованих із фотосинтетичних мембран РЦ за відсутності екзогенних донорів електрона, електрон від фотовідновлених акцепторів повертається після виключення збуджувального світла назад до окисненого бактеріохлорофілу.

На даному етапі накопичений експериментальний матеріал переконує в принциповій необхідності адекватного фізичного опису процесів транспорту електрона у фотосинтетичних РЦ, врахування конформаційних флуктуацій макромолекулярної системи, можливості її еволюції за конформаційними мікростанами, ймовірності структурних перебудов білка на окремих етапах електронного транспорту [3, 6, 7]. Конформаційна динаміка грає ключову роль і в ефективній часовій стабілізації електрона в хінонному акцепторному ланцюгу фотосинтетичних РЦ пурпурових бактерій [8–10]. Важливе функціональне значення ефективної роботи цієї ділянки електрон-транспортного ланцюга визначається перш за все тим, що саме він сполучає дуже швидкі початкові стадії індукованого світлом розділення зарядів з суттєво більш повільними, контрольованими дифузією, реакціями перенесення відновлювальних еквівалентів у фотосинтетичну мембрану. У кінцевому результаті дві молекули хінонової природи, —  $Q_A$  та  $Q_B$ , — інтегровані в структуру РЦ пурпурних бактерій, активно залучаються в спряжені електрон-протон транспортні процеси, які призводять до формування протонного градієнту через фотосинтетичну мембрану, необхідного для синтезу АТФ. На основі конкретних експериментальних даних було побудовано одну з перших моделей конформаційних переходів у фотосинтетичних РЦ, яка контролює спрямованість та швидкість електронного транспорту в акцепторній частині РЦ [11]. Детальний аналіз немоноекспоненційної кінетики темної рекомбінації окисненого світлом фотоактивного бактеріохлорофілу та відновлених хінонних акцепторів, залежності характерного часу процесу від режимів світлової активації, температури зразків дозволяє представити РЦ пурпурних бактерій як систему, здатну до самоорганізації, де багаторазове повторення елементарних електрон-транспортних актів призводить до появи нових конформаційних підстанів, які сприяють ефективній стабілізації фотоелектрона в акцепторній частині РЦ, що перешкоджає функціонально невігідній рекомбінації фотопродуктів [12, 13].

На даний момент стає очевидним, що в ході трансмембранного транспорту електрона від фотоактивного пігменту до кінцевого хі-

нонного акцептора у структурі РЦ процеси, які супроводжуються стабілізацією електрона на хінонній акцепторній ділянці, носять генералізований характер. Очевидно, з генералізованістю структурно-динамічних змін у РЦ пов'язаний і розвиток довгоживучих станів з розділеними між Р та хінонними акцепторами зарядами, оскільки до цього часу не вдається однозначно локалізувати зміни в структурі РЦ, які обумовлюють прогресивне сповільнення часу оберненого темного відновлення Р, який окиснюється тривалим постійним світлом [14, 15]. Подальший детальний кінетичний аналіз немоноекспоненційності кінетик взаємодії фотоактивного бактеріохлорофілу з хінонним акцептором в умовах тривалої активації зразків РЦ світлом різної інтенсивності може надати додаткову інформацію про структурно-динамічні зміни в РЦ, пов'язані з транспортом електрона між димером Р та хінонними акцепторами. Це і є предметом даної роботи.

## 2. МЕТОДИКА ЕКСПЕРИМЕНТУ

Дослідження виконували на РЦ, ізольованих з бактерій *Rhodobacter sphaeroides* дикого типу. Хроматофори бактерій солюбілізували детергентом LDAO, РЦ відділяли від інших мембранних компонентів хроматографією на колонці з гідроксиапатитом, що детально описано в [16]. Ізольовані РЦ суспендувались в 0,01 М Na–P буфері, рН 7,2, який містив 0,05% LDAO. Вимірювальна кювета мала розміри 3×1×2,5 см при товщині стінок 2 мм.

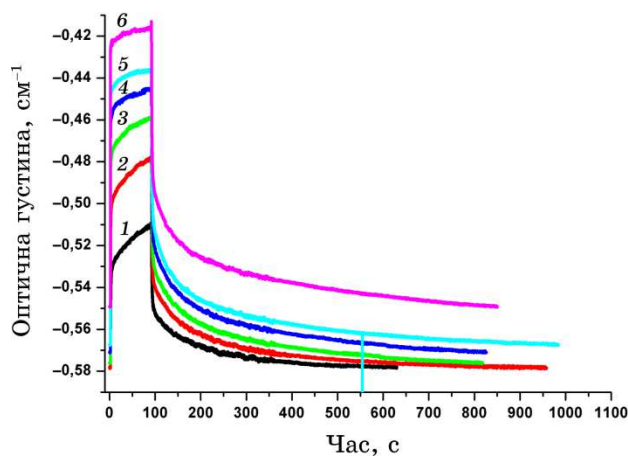
Розчин РЦ з концентрацією  $\sim 10^{-6}$  М витримувався в темноті при кімнатній температурі не менше 12 годин (темноадаптований стан). Світлоадаптований стан формувався при освітленні розчину РЦ імпульсами світла різної тривалості та інтенсивності. Відносна кількість центрів поглинання та швидкість переходу РЦ з одного стану в інший визначались за кінетикою вицвітання лінії ( $\lambda = 865$  нм) спектра оптичного поглинання РЦ.

## 3. ОДЕРЖАНІ РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

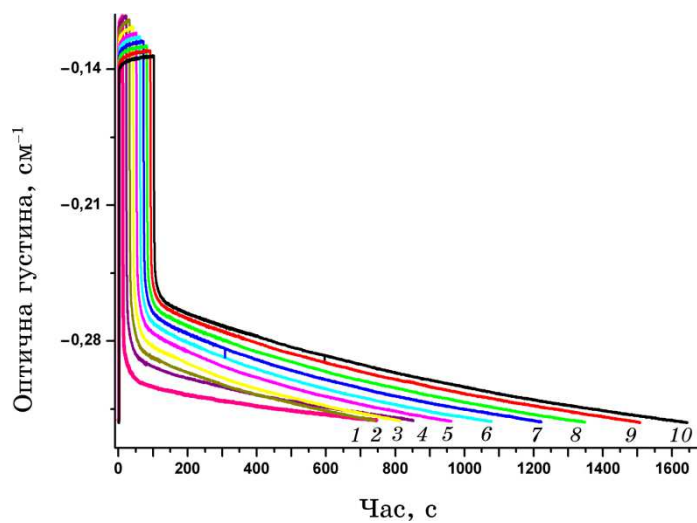
На даний момент у літературі для опису електронних процесів у РЦ використовують дворівневу схему. Відповідно до такої моделі РЦ знаходиться в основному стані (1), коли електрон локалізований на донорі. При поглинанні кванта світла РЦ переходить у збуджений стан, а електрон переміщується на акцептор — стан (2). Кінетика процесу в такій моделі задається швидкостями прямого й оберненого переходів  $k_{12}$  і  $k_{21}$  відповідно.  $x_1$  і  $x_2$  — ймовірність знаходження електрона в 1 і 2 стані. Тоді кінетика процесів, що відбуваються в РЦ під дією світла, може бути описана таким балансним рівнянням:

$$\frac{dx_1}{dt} = -k_{12}x_1 + k_{21}x_2,$$

$$x_1 + x_2 = 1.$$



**Рис. 2.** Кінетика зміни оптичної густини при різних інтенсивностях: 1 — 0,2 мВт/см<sup>2</sup>; 2 — 0,5 мВт/см<sup>2</sup>; 3 — 1 мВт/см<sup>2</sup>; 4 — 2 мВт/см<sup>2</sup>; 5 — 4 мВт/см<sup>2</sup>; 6 — 6 мВт/см<sup>2</sup>, час освітлення — 90с.



**Рис. 3.** Кінетика релаксації при різних тривалості освітлення (1 — 10 с; 2 — 20 с; 3 — 30 с; 4 — 40 с; 5 — 50 с; 6 — 60 с; 7 — 70 с; 8 — 80 с; 9 — 90 с; 10 — 100 с), інтенсивність 6 мВт/см<sup>2</sup>.

Вважаючи, що  $k_{12}$  і  $k_{21}$  стали, одержуємо розв'язок диференціального рівняння з постійними коефіцієнтами:

$$x_1(t) = k_{21}(k_{12} + k_{21})^{-1} + k_{12}(k_{12} + k_{21})^{-1} \exp[-(k_{12} + k_{21})t].$$

Досліджувалася кінетика фотозбудження і релаксації РЦ фотосинтетичних бактерій при різних режимах фотоактивації зразка: при однаковій тривалості, але дискретно змінній інтенсивності фотозбудження, та при заданій інтенсивності фотозбуджувального світла, але різній тривалості засвічення (рис. 2, 3).

Як видно з графіків (рис. 2, 3), кінетика просвітлення та потемніння розчину РЦ залежить від того з якою інтенсивністю і скільки часу відбувається освітлення зразка. Видно, що при збільшенні інтенсивності та часу експозиції відновлення поглинання відбувається повільніше. При зростанні тривалості й інтенсивності освітлення електрон довше знаходиться на  $Q_B$ , і йому стає все складніше повернутися на донор. Це може свідчити про вплив ефектів поляризації на процеси електронного внутрішнього молекулярного транспорту.

Система кінетичних диференціальних балансних рівнянь з постійними коефіцієнтами для РЦ має розв'язок у вигляді експонент. Тому часову залежність коефіцієнта оптичного поглинання можна представити у вигляді розкладу на певну кількість експонент за

формулою:  $A = \sum_{i=1}^n A_i e^{-d_i t}$ , де  $A_i$  — ваговий множник,  $d_i$  — декре-

мент експоненти в  $s^{-1}$ . Для цього використовувалась спеціальна процедура апроксимації, що відбувалась наступним чином. Декремент  $d_1$  підбирався в межах від 0,0001 до 100. Знаходилося оптимальне значення вагового передекспоненційного множника  $A_1$ , при заданому  $d_1$ , таким чином, щоб середньоквадратичне відхилення кривої апроксимації від експериментальної було мінімальним. Знайдені значення фіксувалися і виконувалась аналогічна процедура пошуку показників  $A_2$  і  $d_2$  для другої експоненти. Потім фіксувалися  $A_2$  і  $d_2$  і знову підбирались  $A_1$  і  $d_1$ . Процедура закінчувалась, коли на черговому кроці досягалось мінімальне значення для даної процедури. Тоді починався підбір  $A_3$  і  $d_3$  і т.д. Програма визначає кількість експонент, при якій похибка буде найменшою. У нашому випадку експериментальні криві кінетики електронного транспорту РЦ гарно апроксимуються сумою трьох експонент з постійними декрементами. Для цього випадку система з двома станами не підходить, тому що вона має розв'язок у вигляді однієї експоненти.

Можливі такі моделі системи: 1) з двома станами зі змінними в часі мікрошвидкостями; 2) з трьома станами зі змінними в часі мікрошвидкостями; 3) з чотирма станами з постійними мікрошвидкостями; 4) з чотирма станами зі змінними в часі мікрошвидкостями.

Система з двома змінними в часі мікрошвидкостями вже досліджувалась. Одержано часові залежності мікрошвидкостей  $k_{12}$  та  $k_{21}$  для процесів окиснення та відновлення. Однак вигляд цих залежностей потребує додаткових досліджень.

Нами було обрано модель РЦ як систему з чотирма станами з постійними коефіцієнтами  $k_{ij}$ . Тому що система з трьома станами зі змінними в часі коефіцієнтами складніша, бо не можна одержати часові залежності мікрошвидкостей з експерименту. Розгляд системи з чотирма станами з постійними коефіцієнтами, при різних режимах фотозбудження, дає можливість одержати ці часові залежності і в майбутньому використати їх при роботі з системою з трьома станами зі змінними в часі коефіцієнтами.

Отже, ми вибирали модель електронного транспорту з чотирма станами системи РЦ, якій відповідає система із трьох кінетичних диференціальних балансних рівнянь з постійними коефіцієнтами та рівняння стану:

$$\begin{aligned}\frac{dx_1}{dt} &= -(k_{12} + k_{13} + k_{14})x_1 + k_{21}x_2 + k_{31}x_3 + k_{41}x_4, \\ \frac{dx_2}{dt} &= k_{12}x_1 - (k_{21} + k_{23} + k_{24})x_2 + k_{32}x_3 + k_{42}x_4, \\ \frac{dx_3}{dt} &= k_{13}x_1 + k_{23}x_2 - (k_{31} + k_{32} + k_{34})x_3 + k_{43}x_4, \\ x_1 + x_2 + x_3 + x_4 &= 1.\end{aligned}$$

Зробивши заміну змінних, щоб перетворити систему в однорідну:

$$\begin{aligned}y_1 &= x_1 + h_1, \\ y_2 &= x_2 + h_2, \\ y_3 &= x_3 + h_3,\end{aligned}$$

одержуємо загальний розв'язок цієї системи:

$$X_i(t) = C_{i,1} \exp(-d_1 t) + C_{i,2} \exp(-d_2 t) + C_{i,3} \exp(-d_3 t),$$

де  $C_1, C_2, C_3$  — сталі, які знаходяться за заданими початковими умовами для процесу окиснення:  $X_1(0) = 1$ ,  $X_2(0) = 0$ ,  $X_3(0) = 1$ ,  $X_4(0) = 1$ . Для процесу віднови  $X_1(0), X_2(0), X_3(0), X_4(0)$  дорівнюють значенням  $X_1(t_{\text{exp}}), X_2(t_{\text{exp}}), X_3(t_{\text{exp}}), X_4(t_{\text{exp}})$  у процесі окиснення. Декременти виражаються через певні співвідношення між  $k_{ij}$ .

Фізичний зміст даної моделі електронного транспорту полягає в тому, що система може бути описана чотирма електрон-конформаційними станами (з постійними 12-ма мікрошвидкостями).



ми), що можуть переходити один в одного (рис. 4). Електрон-конформаційні взаємодії в РЦ відбуваються при попаданні електрона в поляризоване середовище, що утворене групами амінокислотних залишків навколо вторинного акцептора  $Q_B$ . Середовище поляризується і утворюється самоузгоджене поле, еквівалентне потенційній ямі для електрона. Поляризаційна деформація може призводити до стану, відокремленого від вихідного стану енергетичним бар'єром. У біополімерах поляризація призводить до руху системи за конформаційними ступенями свободи в напрямку досягнення мінімуму по поверхні потенціальної енергії ядерної підсистеми.

Аналіз даної ситуації показує, що внутрішня динаміка білків носить характер обмеженої дифузії. Це означає, що зміщення атомних груп навколо їх середніх положень потребує певної перебудови найближчого оточення і подолання активаційних бар'єрів, але рух цих груп обмежений за амплітудою, яка не перевищує величини порядку Онгстрема. Характерні значення коефіцієнта обмеженої дифузії складають при звичайних умовах порядку  $10^{-10}$  см<sup>2</sup>/с, що відповідає ефективній в'язкості білкової глобули порядку сотень пуазів. Такі перебудови дуже важливі для підлаштування конфігурації білків і субстратів, що їх зв'язують, у хімічно реакційноздатні стани [13].

У діючій фотосинтетичній системі РЦ рівноважні конформації молекул у присутності і за відсутності електрона можуть сильно різнитися внаслідок цих електрон-конформаційних взаємодій. Після захоплення електрона молекула акцептора РЦ знаходиться в нерівноважній конформації, що починає повільно релаксувати до рівноважної, переходячи з одного локального мінімуму в інший, на кривій потенціальної енергії. Це створює динамічну картину еволюції структурних змін, яка характеризується змінними в часі мікрошвидкостями.

Можна розглядати дві моделі.

1. Система, в якій ансамбль РЦ складається з трьох фракцій, і

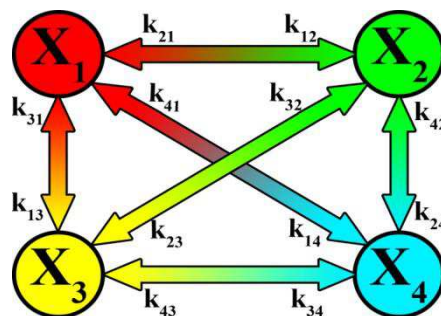


Рис. 4. Ілюстрація моделі РЦ як системи з чотирма станами.

внаслідок освітлення РЦ одні фракції більше піддаються структурним змінам, а інші менше. Таким чином ансамбль РЦ характеризується трьома додатковими станами.

2. Система, в якій всі РЦ в темноадаптованому стані однакові, а внаслідок освітлення система може з деякою імовірністю потрапити або в стан 2, або в стан 3, або в стан 4. Таким чином система теж характеризується чотирма станами з різною заселеністю.

Розглянемо першу модель: РЦ можуть сильно відрізнятись за часом релаксації (на 2–3 порядки). В живих бактеріях це малоімовірно. Крім того, в цьому випадку важко уявити, що різні фракції можуть переходити одна в одну. Тому використовуватимемо другу модель, в якій всі РЦ однакові. Внаслідок збудження певна кількість РЦ може перейти з 1-го стану в 2-й стан, певна кількість в 3-й і певна кількість 4-й електрон-конформаційні стани. Кожен РЦ може переходити з одного електрон-конформаційного стану в інший, внаслідок електрон-конформаційної взаємодії. Імовірність таких переходів характеризується заселеністю цих станів. Характер величин мікрошвидкостей відображає взаємодію станів між собою.

За допомогою експериментальних даних (заселеність 1-го стану), які можна апроксимувати у вигляді розкладу на експоненти, було розв'язано обернену задачу (за заданим розв'язком системи диференціальних рівнянь шукаємо параметри цієї системи) і одержано набори мікрошвидкостей ( $k_{ij}$ ) для процесу окиснення при різних режимах фотоактивації розчину РЦ. Процес оптимізації побудований таким чином, що номер стану визначається порядковим номером при обчисленні. Спочатку визначається значення  $k_{12}$  та  $k_{21}$  при нульових значення інших параметрів. Потім визначаються коефіцієнти  $k_{13}$  та  $k_{31}$  при фіксованих значення  $k_{12}$  та  $k_{21}$  та нульових значення всіх інших параметрів. Потім розраховуються коефіцієнти  $k_{14}$  та  $k_{41}$ , при фіксованих значення  $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ,  $k_{13}$ ,  $k_{31}$  та нульових значення всіх інших параметрів. Після цього знову повертаємось до розрахунку  $k_{12}$  та  $k_{21}$ , але вже при фіксованих значення  $k_{13}$ ,  $k_{31}$ ,  $k_{14}$ ,  $k_{41}$  та нульових значення всіх інших параметрів. Потім визначаються коефіцієнти  $k_{13}$  та  $k_{31}$  і так далі. Повторюються розрахунки до того часу, поки значення мікрошвидкостей не будуть відрізнятись від попередніх розрахунків у визначених межах. Після цього фіксуються коефіцієнти  $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ,  $k_{13}$ ,  $k_{31}$ ,  $k_{14}$ ,  $k_{41}$  і розраховуються по черзі перехресні параметри  $k_{23}$ ,  $k_{32}$ ,  $k_{24}$ ,  $k_{42}$ ,  $k_{34}$ ,  $k_{43}$ . Потім все повторюється спочатку при фіксованих значення перехресних членів. Після визначення всіх 12 мікрошвидкостей, програма фіксує дисперсію цих розрахунків. І по закінченню оптимізації вибирається той набір коефіцієнтів, що характеризується мінімальною дисперсією.

Після розв'язку задачі для процесу окиснення розв'язувалась задача для процесу відновлення. Дані про заселеність на момент виключення світла використовувались як початкові умови для

розв'язку задачі для процесу відновлення.

Отже, одержано два набори (таблиці 1, 2): для процесу окиснення — 12 максимально можливих мікрошвидкостей і для процесу відновлення (який характеризується відсутністю освітлення) — 9, тому що відсутні переходи з 1-го стану в 2-й, 3-й та 4-й стани ( $k_{12}, k_{13}, k_{14} = 0$ ).

Проаналізувавши дані, можна зробити висновки, що процеси окиснення і відновлення характеризуються різними значеннями мікрошвидкостей, тому що структурні зміни в РЦ відбуваються під дією зовнішніх чинників (освітлення), а релаксація (відновлення РЦ) — процес самостійний, тому чисельні значення мікрошвидкостей для цих процесів різні. На основі цих наборів одержано заселеності 1-го, 2-го, 3-го та 4-го станів РЦ, для різних режимів фотозбудження (рис. 5–8). З одержаних залежностей видно, що як процес окиснення, так і відновлення в межах похибки добре збігається з кінетикою заселеності 1-го стану, яку було одержано експериментально. Отже, ми можемо довіряти одержаним результатам для заселеності 2-го, 3-го та 4-го станів при різних режимах фотозбудження системи РЦ.

Проаналізуємо процес окиснення при інтенсивності освітлення  $I = 0,2$  мВт/см<sup>2</sup>: спочатку йде процес заселення 2-го стану з 1-го, але починаючи з 3 с заселеність у 3-му і 4-му стані — збільшується з часом за рахунок зменшення заселеності станів 2 та 1. Це говорить про те, що в процесі збудження РЦ не лише з 1-го стану, але й з стану 2 переходять у стани 3 і 4 (рис. 5). Після вимкнення збуджувального світла спостерігаємо різке зменшення заселеності 2-го стану, що була найбільшою на момент вимкнення світла та плавне зменшення заселеності 3-го. Заселеність 4-го стану збільшується протягом 40 с, а потім плавно зменшується.

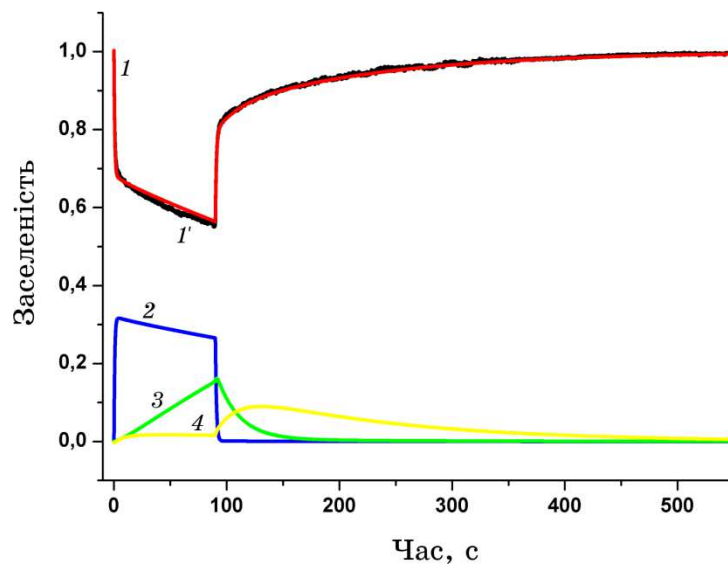
При освітленні з більшою інтенсивністю  $I = 2$  мВт/см<sup>2</sup> (рис. 6) в процесі окиснення: спочатку спостерігаємо заселення 2-го стану з 1-го, але починаючи з 0,8 с знову заселеність у 3-му і 4-му стані — збільшується з часом, за рахунок зменшення заселеності станів 2 та 1. А з 17 с зростає заселеність лише 4-го стану, за рахунок зменшення усіх інших. Після вимкнення збуджувального світла спостерігаємо різке зменшення заселеності 4-го стану, що була найбільшою на момент вимкнення освітлення, та плавне зменшення заселеності 2-го стану. Заселеність 3-го після припинення фотозбудження впродовж 33 с збільшується, а потім плавно зменшується. Якщо ще збільшити інтенсивність освітлення до  $I = 6$  мВт/см<sup>2</sup> (рис. 7), то в процесі окиснення спочатку спостерігаємо заселення 2-го стану з 1-го, але починаючи з 0,5 с заселеність у 3-му і 4-му стані збільшується з часом за рахунок зменшення заселеності станів 2 та 1. А з 13 с зростає заселеність лише 4-го стану за рахунок зменшення усіх інших.

ТАБЛИЦЯ 1. Мікрошвидкості для процесу окиснення РЦ: час — 90 с, інтенсивність 0,2–6 мВт/см<sup>2</sup>.

$I, \text{ мВт/см}^2$	$k_{12}, \text{ с}^{-1}$	$k_{21}, \text{ с}^{-1}$	$k_{23}, \text{ с}^{-1}$	$k_{32}, \text{ с}^{-1}$	$k_{34}, \text{ с}^{-1}$	$k_{43}, \text{ с}^{-1}$	$k_{13}, \text{ с}^{-1}$	$k_{31}, \text{ с}^{-1}$	$k_{24}, \text{ с}^{-1}$	$k_{42}, \text{ с}^{-1}$	$k_{14}, \text{ с}^{-1}$	$k_{41}, \text{ с}^{-1}$
0,2	0,471	0,9995	$5,01 \cdot 10^{-4}$	$1,10 \cdot 10^{-6}$	$1,10 \cdot 10^{-6}$	$5,49 \cdot 10^{-2}$	0,0012	$1,00 \cdot 10^{-6}$	$6,16 \cdot 10^{-3}$	$4,94 \cdot 10^{-2}$	$1,00 \cdot 10^{-6}$	$1,00 \cdot 10^{-6}$
0,5	1,5085	1,49375	$7,70 \cdot 10^{-4}$	$4,87 \cdot 10^{-2}$	$2,17 \cdot 10^{-2}$	$5,58 \cdot 10^{-4}$	0,02554	$7,51 \cdot 10^{-4}$	$1,59 \cdot 10^{-4}$	$1,10 \cdot 10^{-6}$	$1,00 \cdot 10^{-6}$	$1,00 \cdot 10^{-6}$
1	3,94725	1,407386	$0,01 \cdot 10^{-4}$	$1,10 \cdot 10^{-6}$	$1,10 \cdot 10^{-6}$	$5,83 \cdot 10^{-2}$	0,01884	$1,39 \cdot 10^{-4}$	$5,35 \cdot 10^{-3}$	$1,11 \cdot 10^{-1}$	0,007	$6,89 \cdot 10^{-3}$
2	6,66	1,81312	0,07201	0,15489	$7,07 \cdot 10^{-3}$	$1,09 \cdot 10^{-5}$	0,01526	$1,01 \cdot 10^{-5}$	$1,06 \cdot 10^{-5}$	$1,07 \cdot 10^{-5}$	0,024	$1,03 \cdot 10^{-5}$
4	23,59125	6,22	0,05276	0,2087	$1,08 \cdot 10^{-5}$	$3,38 \cdot 10^{-3}$	0,09032	$7,07 \cdot 10^{-3}$	$3,79 \cdot 10^{-3}$	$1,07 \cdot 10^{-5}$	0,01974	$1,03 \cdot 10^{-5}$
6	40,81	5,01	0,07701	0,14101	$2,50 \cdot 10^{-2}$	$1,09 \cdot 10^{-5}$	$1,00 \cdot 10^{-5}$	$1,60 \cdot 10^{-2}$	$1,06 \cdot 10^{-5}$	$1,07 \cdot 10^{-5}$	0,01981	$1,03 \cdot 10^{-5}$

ТАБЛИЦЯ 2. Мікрошвидкості для процесу відновлення РЦ: час — 90 с, інтенсивність 0,2–6 мВт/см<sup>2</sup>.

$I, \text{ мВт/см}^2$	$k_{12}, \text{ с}^{-1}$	$k_{21}, \text{ с}^{-1}$	$k_{23}, \text{ с}^{-1}$	$k_{32}, \text{ с}^{-1}$	$k_{34}, \text{ с}^{-1}$	$k_{43}, \text{ с}^{-1}$	$k_{13}, \text{ с}^{-1}$	$k_{31}, \text{ с}^{-1}$	$k_{24}, \text{ с}^{-1}$	$k_{42}, \text{ с}^{-1}$	$k_{14}, \text{ с}^{-1}$	$k_{41}, \text{ с}^{-1}$
0,2	0	0,921	$9,33 \cdot 10^{-2}$	$5,60 \cdot 10^{-3}$	$2,81 \cdot 10^{-2}$	$1,32 \cdot 10^{-3}$	0	$1,62 \cdot 10^{-2}$	$3,20 \cdot 10^{-2}$	$7,15 \cdot 10^{-3}$	0	$1,00 \cdot 10^{-6}$
0,5	0	0,992871	$0,05 \cdot 10^{-2}$	$2,40 \cdot 10^{-2}$	$1,10 \cdot 10^{-6}$	$6,98 \cdot 10^{-5}$	0	$9,39 \cdot 10^{-4}$	$1,10 \cdot 10^{-6}$	$1,40 \cdot 10^{-3}$	0	$2,42 \cdot 10^{-3}$
1	0	0,155231	$0,00 \cdot 10^{-6}$	$1,10 \cdot 10^{-6}$	$4,14 \cdot 10^{-4}$	$4,50 \cdot 10^{-3}$	0	1,03359	$1,99 \cdot 10^{-1}$	$1,10 \cdot 10^{-6}$	0	$1,00 \cdot 10^{-6}$
2	0	0,02543	0,00749	0,00568	$1,10 \cdot 10^{-6}$	$1,10 \cdot 10^{-6}$	0	$1,00 \cdot 10^{-6}$	$1,10 \cdot 10^{-6}$	$1,10 \cdot 10^{-6}$	0	1,08
4	0	1,091	0,00418	0,1914	$1,10 \cdot 10^{-6}$	$3,74 \cdot 10^{-3}$	0	$1,69 \cdot 10^{-1}$	$1,10 \cdot 10^{-6}$	$1,10 \cdot 10^{-6}$	0	$1,00 \cdot 10^{-6}$
6	0	0,0314	0,0085	0,0051	$1,10 \cdot 10^{-6}$	$7,45 \cdot 10^{-2}$	0	$1,00 \cdot 10^{-6}$	$1,10 \cdot 10^{-6}$	$1,10 \cdot 10^{-6}$	0	1,02

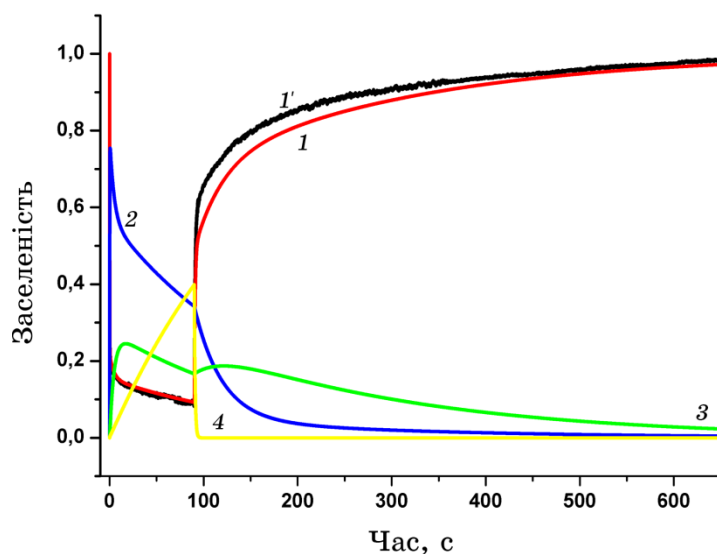


**Рис. 5.** Заселеність 1, 2, 3 та 4 станів при інтенсивності освітлення  $I = 0,2$  мВт/см<sup>2</sup> та експозиції 90 с ( $1'$  — експеримент; 1 — 1-й стан; 2 — 2-й стан; 3 — 3-й стан; 4 — 4-й стан).

Після вимкнення збуджувального світла спостерігаємо різке зменшення заселеності 4-го стану, що була найбільшою на момент вимкнення, та плавне зменшення заселеності 2-го стану. Заселеність 3-го після припинення фотозбудження впродовж 35 с збільшується, а потім плавно зменшується.

Аналіз залежностей окиснення при освітленні з різною інтенсивністю дозволив встановити, що декремент  $d_1$  (з процедури апроксимації експериментальних кривих) якісно збігається з мікрошвидкістю  $k_{12}$  (рис. 8). Це дозволяє припустити, що ці параметри характеризують швидкі електронні процеси за відсутності будь-яких конформацій.

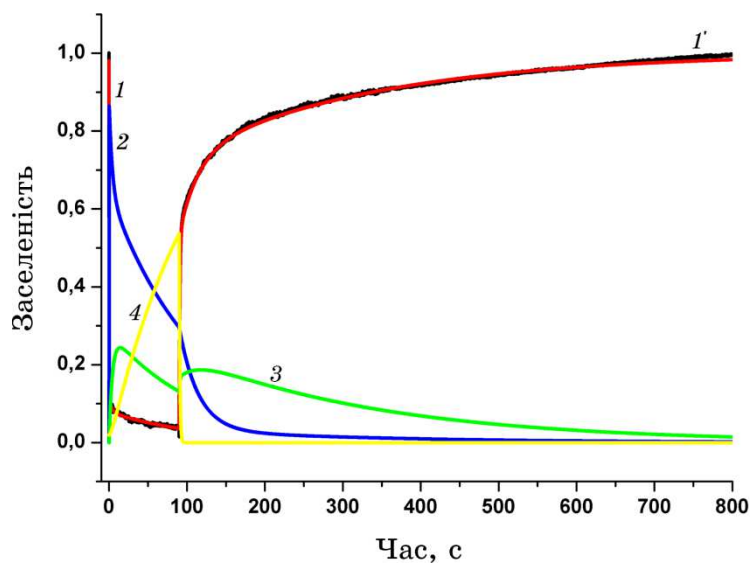
Як видно з графіка (рис. 8), мікрошвидкість  $k_{21}$ , що характеризує повернення електрона в процесі окиснення з стану 2 в стан 1, майже не змінюється при освітленні з інтенсивністю світла в діапазоні від 0,2 до 2 мВт/см<sup>2</sup> і росте зі збільшенням інтенсивності світла в діапазоні від 2 до 6 мВт/см<sup>2</sup>. Тобто чим сильніше ми свіtimo, тим менше електрон затримується на хіноні. Це можна пояснити тим, що в напівкласичному наближенні, коли електрон знаходиться на хіноні, система знаходиться в нерівноважному стані: в таких умовах електромагнітна хвиля внаслідок нерезонансної взаємодії може збуджувати коливання електронної підсистеми частинок білкової макромолекули РЦ, яка є частково впорядкованою. А вона в свою чергу, може збуджувати коливання ядерної підсистеми цих частинок.



**Рис. 6.** Заселеність 1, 2, 3 та 4 станів при інтенсивності освітлення  $I = 2$  мВт/см<sup>2</sup> та експозиції 90 с ( $I'$  — експеримент; 1 — 1-й стан; 2 — 2-й стан; 3 — 3-й стан; 4 — 4-й стан).

Це призведе до виникнення локальних колективних збуджень — локальних фононів (фрактонів). Такі колективні збудження можуть полегшувати процес повернення електрона на донор. Це перший процес, що характеризується нерезонансною взаємодією електромагнітної хвилі з РЦ, що знаходиться в нерівноважному стані. В свою чергу, з аналізу експериментальних кривих видно, що при збільшенні інтенсивності та часу експозиції РЦ відновлення поглинання відбувається повільніше. Це другий процес, він характеризується впливом поляризації на процеси електронного внутрішнього молекулярного транспорту. Таким чином, можна припустити, що в процесі окиснення РЦ ми спостерігаємо два конкуруючих процеси: один сприяє тому, що відновлення поглинання відбувається швидше, а другий — повільніше. Як перший, так і другий процеси стимулюють структурні зміни в РЦ.

Крім того, аналізуючи кінетику відновлення, можна зробити такі висновки: якщо заселеність стану на момент вимкнення світла найбільша, то і мікрошвидкості обернених переходів з цього стану, теж мають найбільші чисельні значення. При цьому, крім повернення в стан 1 з 2-го, 3-го та 4-го станів, можливими залишаються переходи між станами 2, 3, 4. По аналогії з процесом окиснення, в процесі відновлення теж можемо виділити 2 процеси і припустити, що перший характеризує лише електронний транспорт без зміни структури РЦ, що відповідає релаксації заселеності того стану, що

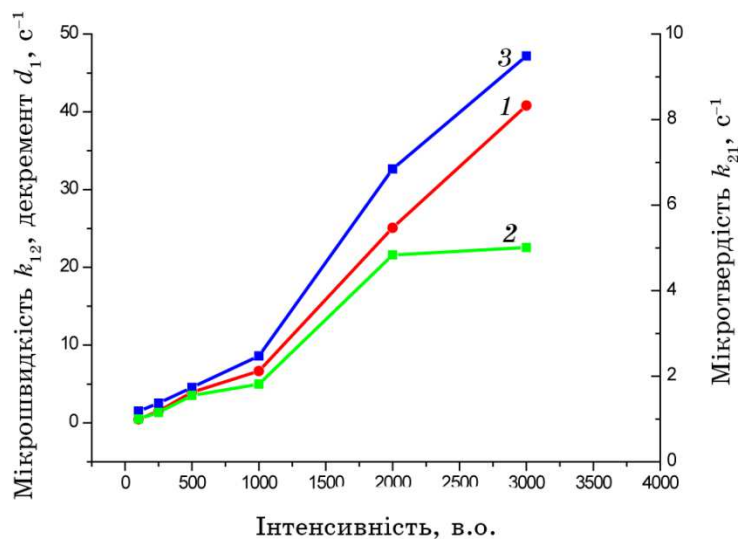


**Рис. 7.** Заселеність 1, 2, 3 та 4 станів при інтенсивності освітлення  $I = 6$  мВт/см<sup>2</sup> та експозиції 90 с ( $I'$  — експеримент; 1 — 1-й стан; 2 — 2-й стан; 3 — 3-й стан; 4 — 4-й стан).

був найбільш заселений в момент вимкнення світла. А другий відображає кінетику структурних змін. При окисненні та відновленні ми спостерігаємо процеси релаксації електронного транспорту, декременти яких сильно відрізняються. Це говорить про те, що система РЦ за короткий час може потрапити в стани, які сильно відрізняються один від одного за часом відновлення, який характеризує структуру РЦ. Тобто процеси переходу з одного стану в інший можуть відбуватися за характером аномальної дифузії ( $E\{x_n^2\} = \sigma^2 < \infty$ ,  $E\{t_n\} = t = \infty$ ). Така дифузія структури може відбуватись, коли перехід відбувається за моделлю дисперсійних стрибків шляхом тунелювання між пастками, що розділені невеликим енергетичним бар'єром.

#### 4. ВИСНОВКИ

На основі виконаного аналізу експериментальних даних, побудовано модель повільного електронного транспорту та структурних змін у вигляді системи з чотирма електрон-конформаційними станами, які характеризуються 12-ма постійними мікрошвидкостями для процесу окиснення та 9-ма для процесу відновлення. В цій моделі всі РЦ однакові: 1-й стан — електрони знаходяться на донорі (темноадаптований стан), 2-й, 3-й та 4-й стани — електрони знаходять-



**Рис. 8.** Кінетика зміни в процесі окиснення: 1 — мікрошвидкість  $k_{12}$ ; 2 — мікрошвидкість  $k_{21}$ ; 3 — декремент  $d_1$ , при інтенсивності освітлення: 0,2–6 мВт/см<sup>2</sup>, час — 90 с.

ся на акцепторі внаслідок фотозбудження. Як в процесі окиснення, так і в процесі відновлення кожен РЦ може переходити з одного електрон-конформаційного стану в інший.

Одержано чисельні значення мікрошвидкостей процесів окиснення та відновлення РЦ і обчислено кінетику заселеності 1-го, 2-го, 3-го та 4-го електрон-конформаційних станів РЦ. Показано якісний збіг експериментальних даних заселеності 1-го стану з результатами обчислень для різних режимів фотозбудження.

Визначено залежності мікрошвидкостей  $k_{12}$  і  $k_{21}$  для процесу окиснення: величина  $k_{12}$  пропорційна інтенсивності освітлення, а  $k_{21}$  майже не змінюється при освітленні з інтенсивністю світла в діапазоні від 0,2 до 2 мВт/см<sup>2</sup> і росте зі збільшенням інтенсивності світла в діапазоні від 2 до 6 мВт/см<sup>2</sup>. Це пояснюється тим, що в процесі фотозбудження РЦ знаходиться в нерівноважному стані під дією електромагнітної хвилі. Це призводить до структурних змін в РЦ.

Зроблено припущення про існування двох конкуруючих процесів, що відбуваються в РЦ при фотозбудженні. Перший прискорює процес повернення електрона на донор, він характеризується нерезонансною взаємодією електромагнітної хвилі з РЦ, що знаходиться в нерівноважному стані. Другий, навпаки, призводить до того, що відновлення поглинання відбувається повільніше. Він характеризується впливом поляризації на процеси електронного внутрішнього молекулярного транспорту. Як перший, так і другий процеси спричиняють структурні зміни в РЦ. Після вимкнення світла в



процесі відновлення спостерігається лише другий процес.

Встановлено: якщо заселеність електрон-конформаційного стану РЦ на момент вимкнення світла найбільша, то і мікрошвидкості обернених переходів з цього стану в процесі відновлення теж мають найбільші чисельні значення.

## ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. А. А. Кононенко, П. П. Нокс, С. К. Чаморовский, А. Б. Рубин, Г. И. Лихтенштейн, Ю. Ф. Крупянский, И. П. Суздаев, В. И. Гольданский, *Хим. физика*, **5**: 795 (1986).
2. А. О. Goushcha, V. N. Kharkyanen, and A. R. Holzwarth, *J. Phys. Chem. B*, **101**: 259 (1997).
3. В. Н. McMahon, J. D. Muller, C. A. Wraight, and G. U. Nienhaus, *Biophys. J.*, **74**: 2567 (1998).
4. J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber, and H. Michel, *Nature*, **318**: 618 (1998).
5. A. Gousha, M. Kapoustina, V. Kharkyanen, and A. Holzwarth, *J. Phys. Chem.*, **38**: 7612 (2007).
6. H. B. Stowell, T. M. McPhillips, D. C. Rees, S. M. Soltis, E. Abresch, and G. Feher, *Science*, **276**: 812 (1997).
7. V. Z. Paschenko, V. V. Gorokhov, N. P. Grishanova, E. A. Goryacheva, B. N. Korvatovsky, P. P. Knox, N. I. Zakharova, and A. B. Rubin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**: 361 (1998).
8. A. O. Goushcha, A. J. Manzo, G. W. Scott, L. N. Christophorov, P. P. Knox, Yu. M. Varabash, M. T. Kapoustina, N. M. Berezetska, V. N. Kharkyanen, *Biophys. J.*, **84**: 1146 (2003).
9. П. П. Нокс, Е. П. Лукашев, А. А. Кононенко, П. С. Венедиктов, А. Б. Рубин, *Мол. биол.*, **11**: 1090 (1977).
10. G. A. Abgaryan, L. N. Christophorov, A. O. Goushcha, A. R. Holzwarth, V. N. Kharkyanen, P. P. Knox, and E. P. Lukashev, *J. Biol. Physics.*, **24**: 1 (1998).
11. Э. Г. Петров, В. Н. Харкянен, П. П. Нокс, А. А. Кононенко, А. Б. Рубин, *Изв. АН СССР. Сер. биол.*, **1**: 28 (1983).
12. А. О. Goushcha, V. N. Kharkyanen, and A. R. Holzwarth, *J. Phys. Chem. B*, **101**: 259 (1997).
13. A. O. Goushcha et al., *Biophys. J.*, **84**: 1146 (2003).
14. S. S. Deshmukh, J.-A. C. Williams, J. P. Allen, and L. Kalman, *Biochemistry*, **50**: 340 (2011).
15. S. S. Deshmukh, J.-A. C. Williams, J. P. Allen, and L. Kalman, *Biochemistry*, **50**: 3321 (2011).
16. N. I. Zakharova and I. Yu. Churbanova, *Biochemistry*, **65**: 181 (2000).