

PACS numbers: 36.20.-r, 82.20.-w, 82.30.-b, 82.37.Vb, 82.39.-k, 82.50.-m, 87.15.-v

Дослідження кінетики фотоіндукованих електронних переходів в наноструктурах бактеріяльних реакційних центрів за допомогою вейвлет-аналізу

М. А. Драпіковський, М. А. Заболотний, Ю. М. Барабаш*,
М. П. Куліш, О. П. Дмитренко

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64,
01033 Київ, Україна*

**Інститут фізики НАН України,
просп. Науки, 46,
03650, МСП, Київ, Україна*

Висока ефективність реакцій фотостимульованого перенесення електрона (ПЕ) у біологічних системах, в тому числі в структурі реакційних центрів, привертає увагу багатьох дослідників. Аналіз основних факторів, що визначають швидкість таких реакцій, важливий як у фундаментальному плані, так і з точки зору створення штучних систем накопичення та перетворення енергії. Встановлено, що ПЕ у біологічних системах відбувається через послідовне ПЕ в структурі білків між металовмісними центрами або органічними донорно-акцепторними групами на віддалі у 5–25 Å. Досліджено кінетику електронного транспорту в бактеріяльних реакційних центрах (РЦ). Досліджено процеси релаксації та фотоіндуковані структурні зміни в молекулярних комплексах РЦ *Rhodobacter sphaeroides* у процесі внутрішньомолекулярного ПЕ. Представлено результати експериментального дослідження залежності мікрошвидкостей переходу між донором та акцептором від інтенсивності та часу засвічення РЦ, а також теоретичного аналізу релаксаційних кривих за допомогою вейвлет-перетворів.

The high efficiency of photostimulated electron-transfer (ET) reactions in biological systems, including within the structure of reaction centres, attracts attention of many researchers. Analysis of the main factors determining the rate of such reactions is important in a fundamental aspect and in terms of creating artificial systems for storage and conversion of energy. As revealed, the ET in biological systems occurs as consecutive ET in the structure of proteins between the metal-bearing centres or the organic donor–acceptor groups at a distance of 5–25 Å. In this regard, series of experiments related to ET in the structure of proteins are carried

out. The kinetics of ET in bacterial reaction centres (RC) is investigated. The processes of relaxation and photoinduced structural changes in molecular complexes of the *Rhodobacter sphaeroides* RC in the process of the intramolecular ET. Results of both experimental study of the dependence of microvelocities of transition between donor and acceptor on the intensity and time illumination of RC and theoretical analysis of relaxation curves using wavelet transforms are presented.

Высокая эффективность реакций фотостимулированного переноса электрона (ПЭ) в биологических системах, в том числе в структуре реакционных центров, привлекает внимание многих исследователей. Анализ основных факторов, определяющих скорость таких реакций, важен как в фундаментальном плане, так и с точки зрения создания искусственных систем накопления и преобразования энергии. Установлено, что ПЭ в биологических системах происходит в виде последовательного ПЭ в структуре белков между металлосодержащими центрами или органическими донорно-акцепторными группами на расстоянии в 5–25 Å. Исследована кинетика электронного транспорта в бактериальных реакционных центрах (РЦ). Исследованы процессы релаксации и фотоиндуцированные структурные изменения в молекулярных комплексах РЦ *Rhodobacter sphaeroides* в процессе внутримолекулярного ПЭ. Представлены результаты экспериментального исследования зависимости микроскоростей перехода между донором и акцептором от интенсивности и времени засветки РЦ, а также теоретического анализа релаксационных кривых с помощью вейвлет-преобразований.

Ключові слова: реакційний центр, електронний транспорт, фуллерени, вейвлет-аналіз.

Key words: reaction centre, electron transfer, fullerenes, Wavelet analysis.

Ключевые слова: реакционный центр, электронный транспорт, фуллерены, вейвлет-анализ.

(Отримано 5 жовтня 2015 р.; після доопрацювання — 27 листопада 2015 р.)

1. ВСТУП

Вивчення реакцій перенесення електрону (ПЕ) в структурі білків, спеціально створених природою в процесі еволюції, для втілення цієї функції може бути набагато інформативнішим, ніж дослідження будь-яких інших молекулярних чи наносистем, оскільки в білках взаємне розташування донорно-акцепторних центрів і їх молекулярне оточення повністю ідентичне, що складно забезпечити у випадку штучних молекулярних систем. Стрімкий розвиток біохімічних і молекулярно-генетичних методів модифікації білків уможливило цілеспрямовано змінювати хімічну структуру донорно-акцепторних переходів і їх окиснювально-відновлюваль-

ний потенціал, здійснювати модифікацію амінокислотних залишків на шляху переносу або в оточенні донорно-акцепторних центрів, що впливає на більшість фізичних факторів, що визначають швидкість ПЕ.

Метою роботи є дослідження та аналіз структурних змін, що супроводжуються кінетикою електронного транспорту при фотозбудженні комплексів хлорофілвмісних мембранних білків фотосинтетичних реакційних центрів (РЦ) *Rhodobacter sphaeroides*. Завданням роботи є вивчення кінетики повільної реакції ізольованих комплексів РЦ, що виникає під впливом світла.

Відома безліч фотосинтезувальних організмів. Проте, особливий інтерес викликають бактерії; вони мають відносно простий фотосинтезувальний апарат. Пурпурні бактерії є чи не єдиними живими мікроорганізмами, окрім рослин, які здатні засвоювати світлову енергію та перетворювати її в інші види, зберігати та передавати її на досить великі віддалі фактично без втрат. Пурпурні бактерії досліджуються понад 40 років. Вони визначають процеси фотосинтезу в усіх біоструктурах, уможливають забезпечити розділення фотогенерованих пар носіїв зарядів із ймовірністю, близькою до 1. Тому їх використовують у сонячних батареях і наноелектроніці [1]. Визначальними в каскаді бактеріяльних фотосинтетичних процесів є первинні процеси: поглинання кванта світла, міграція енергії у світлозбірному комплексі, розділення зарядів у фотореакційному центрі, електронний транспорт, спряжене з ними перенесення протонів й інших йонів через мембрану [2].

Система первинних процесів має надзвичайно важливу властивість, що відрізняє її від інших біологічних систем. Система «включається» світлом, і її можна тестувати з допомогою дельта-подібних (лазерний спалах) чи прямокутних (включення постійного світла) імпульсів. Важливим є і та обставина, що з хромофорів фотосинтезувальних бактерій можна виділити біохімічними методами окрему частину — бактеріяльні РЦ; при цьому виділена частина фотосистеми зберігає здатність до поглинання світла та світлоіндукованого розділення зарядів. Вперше про такий комплекс було сказано Емерсоном та Арнольдом у 1932 р. Дюйзенс у 1952 р. навів спектральний доказ його наявності у бактерії [3].

Сьогодні відомі декілька типів РЦ, які відрізняються природою й спектральними властивостями первинного донора електрона і природою вторинного донора та акцептора електрона. Вперше такий комплекс було виділено на початку 1970-х рр. з пурпурових фотосинтетичних бактерій виду *Rhodobacter sphaeroides* [4, 5]. Посилене вивчення структури, характеру дії реакційних центрів за допомогою біохімічної та біофізичної техніки дало

змогу одержати інформацію про функціонування центрів і про їхні структурні та динамічні характеристики [6, 7, 8, 9, 10].

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕТОДИКА

2.1. Реакційні центри пурпурних фотосинтетичних бактерій

Тепер детальніше розглянемо реакційний центр. РЦ являє собою білок, що складається з трьох поліпептидних ланцюгів і має у своєму складі ряд пігментів типу хлорофілу [11]. Молекулярна маса білка більше 135–103 дальтон, і складається він відповідно з більш ніж 104 атомів. При порушенні квантом світла димеру бактеріохлорофілу електрон переноситься з його порушеного рівня послідовно на мономер бактеріохлорофілу, феофітин і первинний акцептор — хінон, опиняючись таким чином за час близько 200 пс на протилежній стороні мембрани. Утворений катіон-радикал бактеріохлорофілу P^+ відновлюється електронами, локалізованими на гемах цитохрому *c*, який у бактеріях *Rhodospseudomonas* утворює міцний комплекс з глобул реакційного центру. В результаті з високим квантовим виходом здійснюється трансмембранний перенос електронів з підвищенням їх потенціалу, котрий перетворюється надалі в хімічну енергію [12, 13].

Розглянемо фотосинтетичний РЦ (рис. 1). Його задача — переносити фотозбуджені електрони на іншу сторону мембрани, і, тим самим, створювати той електричний потенціал, на якому

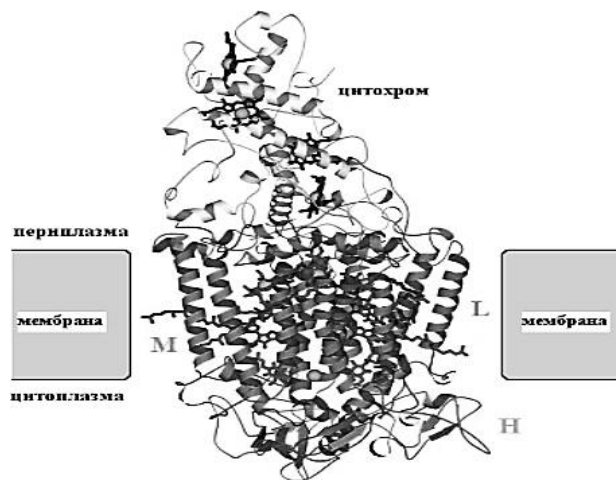
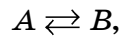


Рис. 1. Фотосинтетичний РЦ [2]. Субодиниці *L* і *M* зв'язують фотосинтетичні пігменти — хлорофіли, феофітини і два хінони. Цитохром містить чотири гема з помаранчевими йонами Феруму всередині.¹

працює фотосинтез.

2.2. Кінетика реакції першого порядку для РЦ

Нехай



де A — стан РЦ, коли електрон знаходиться на донорі; B — стан РЦ, коли електрон знаходиться акцепторі.

Дворівневу модель кінетики електронного транспорту РЦ зі змінними в часі коефіцієнтами можна зобразити у вигляді схеми (рис. 2); 1 і 2 — відповідно стани на донорі та акцепторі.

Мікрошвидкості переходу електрону з донора на акцептор і з акцептора на донор позначимо, через k_{12} і k_{21} . На цьому прикладі вперше стикаємось з процесом в якому зміна концентрації компонентів складається зі швидкості двох процесів. Позначаючи швидкості, можна записати для зміни концентрації c_A :

$$\frac{dc_A}{dt} = k_{12}c_A - k_{21}c_B. \quad (1)$$

Оскільки

$$c_A + c_B = c_A^0 \quad (2)$$

(в принципі реакція може вивчатися в умовах, коли в початковий момент часу присутні дві компоненти, обмежимося випадком коли $c_B^0 = 0$), то можна привести до вигляду:

$$\frac{dc_A}{dt} = (k_{21} + k_{12})c_A - k_{12}c_A^0. \quad (3)$$

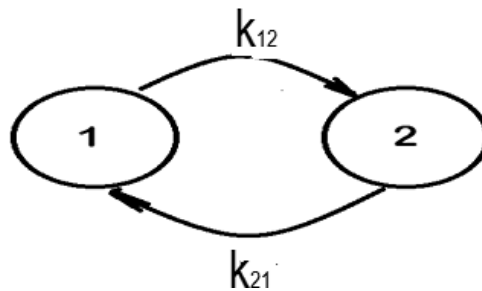


Рис. 2. Схема, що описує процес переходу електрона з донора на акцептор і акцептора на донор.²

Перепишемо у вигляді

$$\frac{dc_A}{(k_{21} + k_{12})c_A - k_{12}c_A^0} = dt, \quad (4)$$

і проінтегрувавши від 0 до t :

$$\frac{1}{(k_{21} + k_{12})} \ln \frac{k_{12}c_A^0}{(k_{21} + k_{12})c_A - k_{12}c_A^0} = t. \quad (5)$$

Запишемо балансні рівняння для концентрації на донорі та акцепторі

$$c_A = \frac{k_{21}}{k_{21} + k_{12}} c_A^0 + \frac{k_{21}}{(k_{21} + k_{12})c_A - k_{12}c_A^0} c_A^0 e^{-(k_{21} + k_{12})t}. \quad (6)$$

Підставляючи (5) в (2), будемо мати рівняння кінетичної кривої для c_B :

$$c_B = \frac{k_{21}}{k_{21} + k_{12}} c_A^0 \left[1 - e^{-(k_{21} + k_{12})t} \right]. \quad (7)$$

Вирази уможливають при відомих k^+ і k^- розрахувати концентрації c_A і c_B при визначеному часі t . За допомогою (5) визначають час, необхідний для перебігу реакції. В сукупності ці три вирази дають вирішення прямої задачі реакції, що описується рівняннями першого порядку.

Із (6) і (7) слідує, що зі збільшенням часу (тобто при $t \rightarrow \infty$) величини c_A і c_B прямують до граничних значень:

$$c_A^\infty = \frac{k_{12}}{k_{21} + k_{12}} c_A^0; \quad c_B^\infty = \frac{k_{21}}{k_{21} + k_{12}} c_A^0. \quad (8)$$

Розглянемо один з альтернативних поглядів, при якому мікрошвидкості постійні. Для цього запишемо ще раз балансні рівняння у спрощеному вигляді:

$$\frac{dc_A}{dt} = -k_{12}c_A + k_{21}c_B, \quad (9)$$

$$\frac{dc_B}{dt} = -k_{21}c_B + k_{12}c_A; \quad (10)$$

це — рівняння, що відповідають зміні концентрації.

Запишемо рівняння системи в спокої:

$$c_A + c_B = 1. \quad (11)$$

Розглянемо систему, що відповідає схемі на (рис. 2), тобто систему з двох станів, що мають постійні мікрошвидкості k_{12} і k_{21} :

$$c_A = 1 - c_B, \quad (12)$$

$$c_B = 1 - c_A, \quad (13)$$

$$\frac{dc_A}{dt} = -k_{12}c_A + k_{21}(1 - c_A); \quad (14)$$

звідси ми одержуємо наступний вираз:

$$\frac{dc_A}{dt} = -k_{12}c_A + k_{21} - k_{21}c_A = -c_A(k_{12} + k_{21}) + k_{21}. \quad (15)$$

Оскільки система зі сталими коефіцієнтами не описує в повній мірі процес, що відбувається, то змінні коефіцієнти можна вирахувати наступним чином виходячи з балансних рівнянь.

Аналіз окиснення —

$$\frac{dc_A}{dt} = -k_{12}c_A + k_{21}c_B; \quad (16)$$

звідси одержуємо початкове балансне рівняння при $t = 0$, тобто у початковий момент часу

$$\frac{dc_A(0)}{dt} = -k_{12}(0)c_A(0) + k_{21}(0)c_B(0). \quad (17)$$

В початковий момент часу $c_B(0) = 0$; тоді

$$k_{12}(0) = -\frac{\frac{dc_A(0)}{dt}}{c_A(0)}; \quad (18)$$

$k_{12} = \alpha I$, тобто від часу не залежить (I — інтенсивність, α — коефіцієнт, що дорівнює ефективному перерізу), тобто мікрошвидкість k_{12} залежить від інтенсивності освітлення.

Тоді

$$\frac{dc_A(0)}{dt} = -k_{12}c_A + k_{21}c_B, \quad (19)$$

$$k_{12} = \alpha I = k_{12}(0), \quad k_{12}(0) = -\frac{\frac{dc_A(0)}{dt}}{c_A(0)} = k_{12}. \quad (20)$$

Підставимо в рівняння (9) рівняння (20):

$$\frac{dc_A}{dt} = \frac{dc_A(0)}{c_A(0)} c_A(t) + k_{21}(t)(1 - c_A), \quad (21)$$

$$\frac{dc_A}{dt} - \frac{dc_A(0)}{c_A(0)} c_A(t) = k_{21}(t)(1 - c_A), \quad (22)$$

$$k_{21}(t) = \frac{\frac{dc_A(0)}{dt} - \frac{dc_A(0)}{c_A(0)} c_A(t)}{(1 - c_A)}. \quad (23)$$

Розглянемо формулу

$$c_A = c_A(t) = \frac{k_{21}}{k_{12} + k_{21}} + \frac{k_{12}}{k_{12} + k_{21}} e^{-(k_{12} + k_{21})t}; \quad (24)$$

тут декременти, тобто коефіцієнти при експоненті $e^{-(k_{21} + k_{12})t}$, не-
суть наступні внески. Сюди внесок дають тільки коефіцієнти К1
з таблиці фітування, К2 і К3 внески давати не можуть. $\frac{k_{21}}{k_{12} + k_{21}}$
— це повільна складова рівняння, що описує процес, тобто кое-
фіцієнти К2 і К3 (тут $k_{12} \gg k_{21}$); тому внесок дає тільки чисель-
ник k_{21} :

$$c_B = c_B(t) = 1 - \frac{k_{21}}{k_{12} + k_{21}} + \frac{k_{12}}{k_{12} + k_{21}} e^{-(k_{12} + k_{21})t}. \quad (25)$$

Декременти k_1, k_2 відрізняються один від одного на порядок. Ек-
спонента з найбільшим коефіцієнтом описує електронний транс-
порт, k_{21} характеризує структурні зміни [14].

2.3. Вейвлет-аналіз

Вейвлет-перетвори сигналів є узагальненням спектрального ана-
лізу. Вейвлети — узагальнена назва сімейств математичних фун-
кцій певної форми, локальних у часі і по частотах, в яких усі
функції одержано з однієї базисної шляхом її зсуву і розтягів по
часовій осі. Вони мають вигляд коротких хвильових пакетів з
інтегральним нульовим значенням, локалізованих по осі аргу-
ментів (незалежних змінних), інваріантних відносно зсуву та ліній-
них по відношенню до операцій масштабування (стиснення, роз-

тяг) [15]. Вейвлети — локалізовані функції, які конструюються з одного материнського вейвлета $y/[t]$ операцією зсуву у часі (b) і зміною часового масштабу (a) $\Psi\left(\frac{(t-b)}{a}\right)$: $\Psi_{ab}(t) = \frac{1}{\sqrt{|a|}} \Psi\left(\frac{(t-b)}{a}\right)$,

$(a, b) \in R$, $\psi(t) \in L^2(R)$, де множник $\frac{1}{\sqrt{|a|}}$ забезпечує незалежність

норми функції від масштабувального числа a . Неперервний інтегральний вейвлет-перетвір сигналу $s(t) \in L^2(R)$, який застосовується для якісного частотно-часового аналізу, за змістом відповідає Фур'є-перетвору зі зміною гармонічного базису $\exp(-i\omega t)$ на вейвлетний $\Psi\left(\frac{(t-b)}{a}\right)$:

$$W(a, b) = (s(t), \Psi_{ab}(t)) = \frac{1}{\sqrt{|a|}} \int_{-\infty}^{\infty} s(t) \Psi\left(\frac{(t-b)}{a}\right) dt, (a, b) \in R \quad [16].$$

Вейвлетний масштабно-часовий спектр $W(a, b)$ на відміну від Фур'є-спектру є функцією двох аргументів: частотного масштабу вейвлета a (в одиницях, обернених частот), та часового зміщення вейвлета по сигналу b (в одиницях часу); при цьому параметри a та b можуть набувати будь-яких значень у межах області визначення [17]:

$$\Psi_{\text{Mhat}}(t, a, b) = \frac{1,031}{\sqrt{2}} \left\{ \exp \left[-\left(\frac{(t-b)}{a} \right)^2 \right] - 2 \left(\frac{(t-b)}{a} \right)^2 \exp \left[-\left(\frac{(t-b)}{a} \right)^2 \right] \right\};$$

$$\Psi_{\text{wave}}(t, a, b) = -\frac{1,786}{\sqrt{2}} \frac{t-b}{a} \exp \left[-\left(\frac{(t-b)}{a} \right)^2 \right].$$

Вейвлет-перетвір уможливило одержати не лише загальну частотну характеристику сигналу, а й відомості про певні локальні

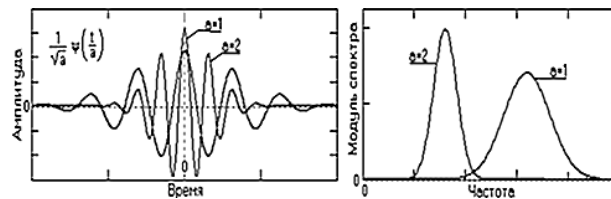


Рис. 3. Наведено приклади вейвлет-функцій двох масштабів [17].³

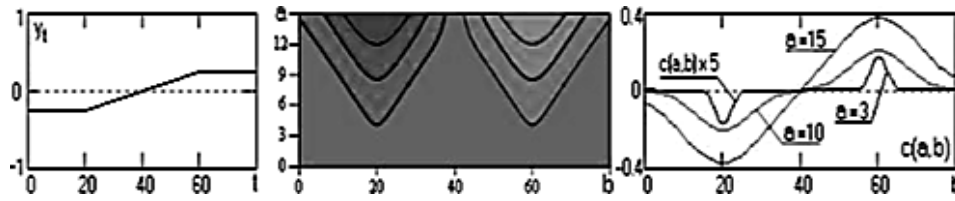


Рис. 4. Сигнал, вейвлетний спектр ($Mhat$) і масштабні перетини спектру [17].⁴

координати, на яких проявляються ті чи інші групи частотних складових, або на яких відбуваються швидкі зміни частотних складових сигналу.

Власний базис функціонального простору утворюється шляхом масштабних перетворень та зсувів породжувального вейвлета

$\psi(t) : \Psi(a, b, t) = |a|^{-\frac{1}{2}} \Psi\left[\frac{(t-b)}{a}\right]$, $a, b \in R$, $a \neq 0$. Вейвлет-перетвір

дає сімейства спектрів масштабних коефіцієнтів a стиснення й розтягнення: $C(a, b) = \int_{-\infty}^{\infty} s(t) |a|^{-\frac{1}{2}} \Psi\left[\frac{(t-b)}{a}\right] dt$. За рахунок зміни ма-

сштабу вейвлети здатні виявляти відмінності на різних частотах, а за рахунок зсуву b проаналізувати властивості сигналу в різних точках на всьому досліджуваному часовому інтервалі. Спектр $C(a, b)$ однорідного сигналу є поверхнею в тривимірному просторі. Способи візуалізації спектру можуть бути різними. Найбільш поширений спосіб — проєкція на площину ab з ізолініями (ізорівнями), що дозволяє прослідкувати зміни коефіцієнтів на різних масштабах по часу, а також виявити картину локальних екстремумів цих поверхонь, так званий «скелет» структури процесу, що аналізується. При широкому діапазоні масштабів застосовуються логарифмічні координати.

Вибір конкретного виду та типу вейвлетів залежить від сигналу і задач аналізу. Вибір типу вейвлета вносить певну суб'єктивність дослідника в методику дослідження сигналів, але в той же час дає нові можливості при пошуку найбільш ефективних та оптимальних методів оброблення сигналів й одержання з них потрібної інформації. Тому для вибору оптимального вейвлета необхідно провести тестування кривих різними типами вейвлетів [17].

3. ОДЕРЖАНІ РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У роботі використовувалися ізольовані білково-пігментні ком-

плекси РЦ, виділені на кафедрі біофізики Московського державного університету з фотосинтетичних мембран клітин *Rhodobacter sphaeroides* за допомогою детергентів двох типів (холат натрію і Тритон 100). Для забезпечення довготривалої стабільності параметрів РЦ використовувався водний розчин 0,01 М натрій-фосфатного буфера з рН 7,2 і добавкою 0,05% детергенту. Вимірювальна кювета мала розміри $3 \times 5 \times 2,5$ см при товщині стінок у 1 мм.

Досліджувався електронний транспорт при фотозбудженні і релаксації РЦ фотосинтетичних бактерій при різних режимах фотоактивації зразка:

1) при однаковій тривалості (90 с), але дискретно змінній інтенсивності фотозбудження (від 0,2 до 6,2 мВт/см²);

2) при заданій інтенсивності фотозбуджувального світла ($I = 6,2$ мВт/см²) з різним часом фотоактивації — від 10 до 100 секунд. Були одержані результати зміни поглинання розчинів з часом при освітленні.

Як видно з графіків кінетики (рис. 5), просвітлення та потемніння розчину залежить від того з якою інтенсивністю ми світимо. При збільшенні інтенсивності кінетика відновлення йде повільніше, що може свідчити про вплив ефектів поляризації на процеси електронного внутрішньомолекулярного транспорту.

Результати, одержані для різних значень експозиції, були оброблені за спеціальною процедурою фітування. Коефіцієнт оптичного поглинання можна розкласти на певну кількість експонент за формулою:

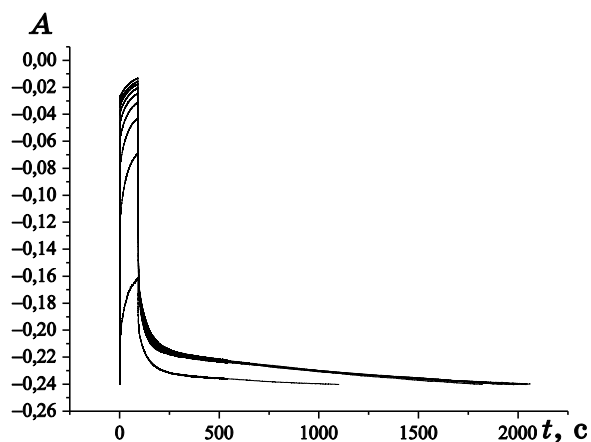


Рис. 5. Кінетика зміни оптичної густини при різних інтенсивностях. Інтенсивність I : 1 — 100, 2 — 500, 3 — 900, 4 — 1300, 5 — 1700, 6 — 2100, 7 — 2500, 8 — 2900, 9 — 3270 у.о. (700 у.о. = 20 Вт/м²); час освітлення — 90 с.⁵

$$A = \sum_{i=1}^n A_i e^{-k_i t},$$

де A_i — ваговий множник; k_i — характерний показник експоненти в с^{-1} .

Процедура фітування відбувається наступним чином. Показник k_1 підбирається в межах від 0 до ∞ таким чином, щоб середньоквадратичний відхил фітувальної кривої від експериментальної був мінімальним. Відповідним чином визначається значення вагового передекспонентного множника. Знайдені значення фіксуються, і проводиться процедура знайдення показників другої експоненти. В свою чергу, результати фітування для двох експонент використовуються для наступної. Процедура закінчується, коли на черговому кроці відхил є більшим за мінімальний.

Програма, написана для виконання цієї процедури, сама визначає кількість експонент. В нашому випадку використовувалися 3 експоненти (рис. 6).

З одержаних даних видно, що декремент першої експоненти на три порядки більший від декременту третьої експоненти. Тобто він відповідає за процеси, які відбуваються в РЦ з набагато більшими швидкостями. В зв'язку з цим, можна розділити кінетику оптичного поглинання на дві частини: швидку та повільну. Швидка характеризує лише електронний транспорт, а повільна — електронний транспорт, що зумовлений повільними конформаційними змінами РЦ. Це також видно з рівнянь (24) і (25).

Вагові множники експонент відображають процеси, які переважають за різних умов освітлення. З рисунку 6 видно, що ваго-

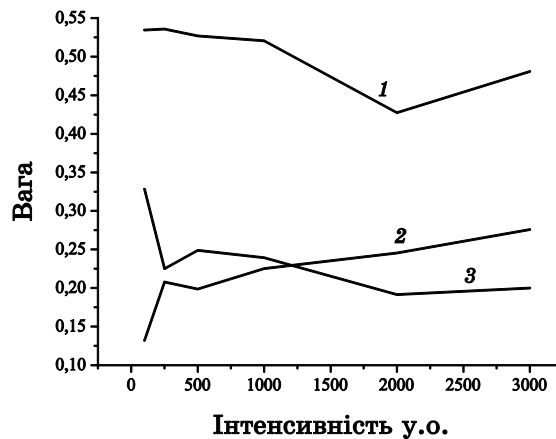


Рис. 6. Співвідношення вагових множників експонент (1, 2, 3 — відповідні вагові множники) кінетики відносно інтенсивності світла.⁶

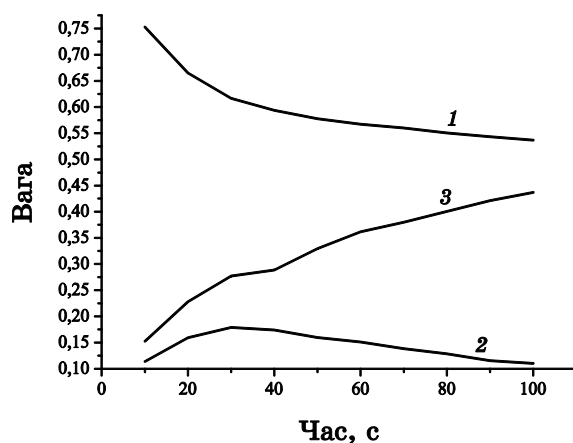


Рис. 7. Співвідношення вагових множників експонент (1, 2, 3 — відповідні вагові множники) кінетики відновлення після різної тривалості фотозбудження.⁷

вий множник першої експоненти після освітлення з більшою інтенсивністю трохи зменшується, а третьої навпаки — збільшується. Тобто електронний транспорт, що зумовлений конформаційними змінами переважає після фотозбудження світлом з більшою інтенсивністю і відповідно кількість РЦ, що піддалися конформаційним змінам зростає зі збільшенням інтенсивності.

Як видно з рис. 7, кінетика просвітлення та потемніння розчину залежить від того, скільки часу ми світимо. Видно, що зі збільшенням часу експозиції відновлення поглинання відбувається повільніше. Це можна пояснити тим, що при зростанні тривалості освітлення електрон довше знаходиться на Q_B , і йому стає все складніше повернутися на донор.

Результати, одержані для різних значень часу експозиції, також були оброблені за спеціальною процедурою фітування [17].

Ваговий множник першої експоненти (рис. 7) після тривалішого освітлення зменшується, а третьої навпаки — збільшується. Отже, кількість РЦ, що зазнають конформаційних змін, зростає при збільшенні часу фотозбудження. Тобто переважає електронний транспорт, що зумовлений конформаційними змінами.

Розглянемо кінетику переходу електрону з донора на акцептор і з акцептора на донор, тобто графіки залежності k_{12} і k_{21} (мікрошвидкостей переходу електрона).

З рисунків 8, 9 можна побачити, що зі збільшенням інтенсивності світла швидкість повернення електрона з акцептора на донор збільшується, не дивлячись на те, що зі збільшенням інтенсивності швидкість релаксації всієї системи зменшується.

З рисунку 10 бачимо (графік 3) пряму, котра була б коли

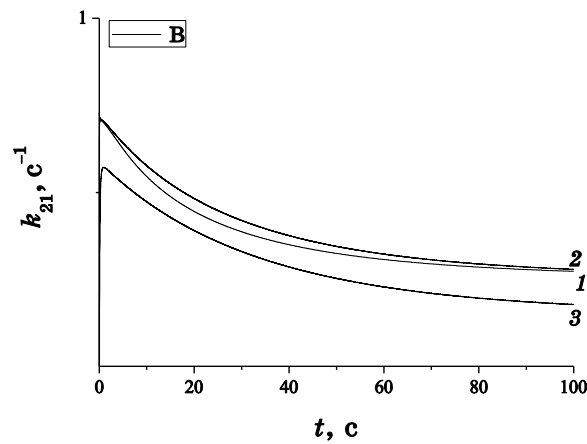


Рис. 8. Кінетика зміни мікрошвидкості переходу електрона з акцептора на донор в залежності від часу. Номером позначено різні інтенсивності засвічення: 1 — 100, 2 — 1200, 3 — 1300 у.о. (700 у.о. = 20 Вт/м²).⁸

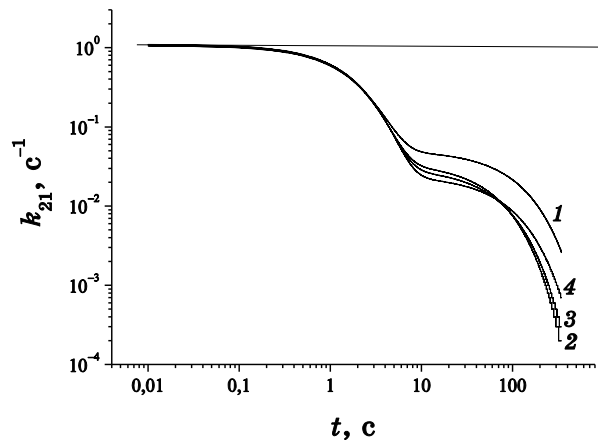


Рис. 9. Кінетика мікрошвидкостей при окисненні при різних тривалостях освітлення; номером позначено різні інтенсивності: 1 — 100, 2 — 1200, 3 — 1300, 4 — 2900 у.о. (700 у.о. = 20 Вт/м²). Червоний графік — просвітлення.⁹

$k_{12} = \alpha I$, тобто було б стале, але оскільки ми одержали криву, то це свідчить, що коефіцієнт не сталий і потрібно переходити до моделей з мультистанами. Збіг кривих 1 і 2 (криву 2 відфітовано) уможлиблює приписати фізичний зміст коефіцієнту k_{12} .

Коефіцієнти при фігуванні мають наступний фізичний зміст: К1 відображає кінетику електронного транспорту, коли структурних змін немає, коефіцієнти К2 і К3 відображають структурні

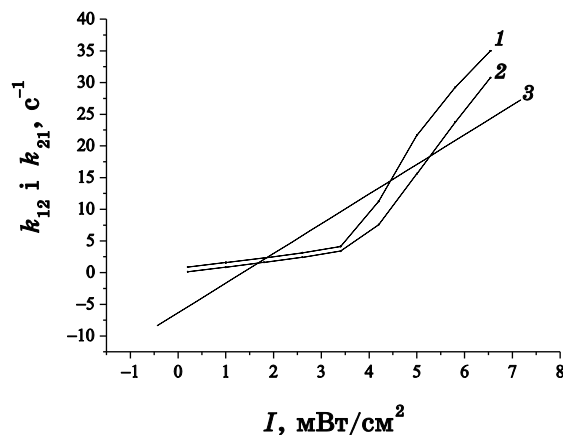


Рис. 10. Графіки залежностей k_{12} (1) і k_{21} (2) від інтенсивності освітлення. 3 — лінійна апроксимація, 1 є відфітованою кривою.¹⁰

зміни, і повертаємося до розв'язку зі сталими коефіцієнтами.

На представлених графіках зміни оптичної густини (рис. 5) ми виділяємо дві складові — швидку та повільну. Дослідження показують, що повільна пов'язана з конформаційними змінами в білкових молекулах при розділенні зарядів. З аналізу релаксаційної кривої можна оцінити зміну структури параметра, який для даного об'єкта є різницею енергетичних рівнів. Оскільки електрон попадає на бактеріофеофітин, а потім за 10^{-10} с на хінон, а повільна компонента, як правило, складає 1–100 с, то вона характеризує час переходу електрона з хінону назад. Цей час визначається різницею рівнів між Q_a та Q_b , і закидання електрона здійснюється термоактивним процесом. Це відбувається тому, що ми працюємо з фотосинтетичними центрами, які одержані з нативних (живих) клітин в процесі їх детергування, коли повернення бактеріофілу у вихідне положення можливе тільки при поверненні електрона з хінону на бактеріохлорофіл. Іншого шляху просто немає. В нативному стані електрон надходить з цитохрому. Ця особливість дещо спрощує схему дослідження і виключає необхідність дослідження інших процесів електронної взаємодії [18, 19, 20].

Деформація протеїну розглядається як зміна різниці енергетичних рівнів між Q_a та Q_b . Цій величині приписується роль структурної змінної. Вибір такої позиції зумовлений і тим, що нам і досі не вдається зафіксувати розміщення функціональних груп в процесі електронного транспорту. При проведенні досліджень було підтверджено залежність густини оптичного поглинання від часу експонування та інтенсивності збуджувального світла. Також було відмічено властивість чіткого контролю поча-

ткового стану розчину. Це обумовлено наявністю пам'яті розчину на світлове збудження. Справа в тому, що при поверненні електрона з бактеріохлорофілу спостерігається залишкова різниця в рівнях.

Повільна динаміка зміни поглинання розчину при його освітленні може бути зв'язана з конформаційними змінами, що проходять в протеїні при електронному транспорті. З рисунків 9, 10 ми бачимо явний вплив на мікрошвидкості переходу електрона між Q_a та Q_b інтенсивності засвічення та часу експозиції.

3.1. Вейвлет-аналіз одержаних результатів

Так як залежність k_{21} для процесу окиснення і відновлення залежить від часу, то для їх аналізу найбільш результативно буде використати вейвлет-аналіз.

Для перевірки фітованих кривих і для аналізу характерних

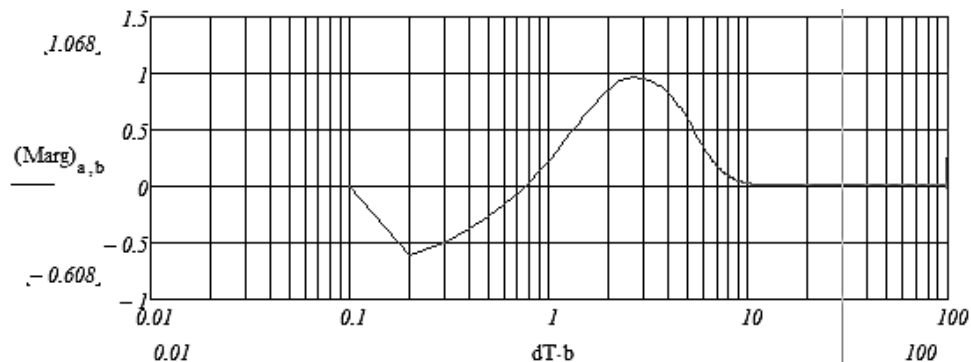


Рис. 11. Вейвлет-спектр Morlet декрементів тестових кривих при відновленні [17].¹¹

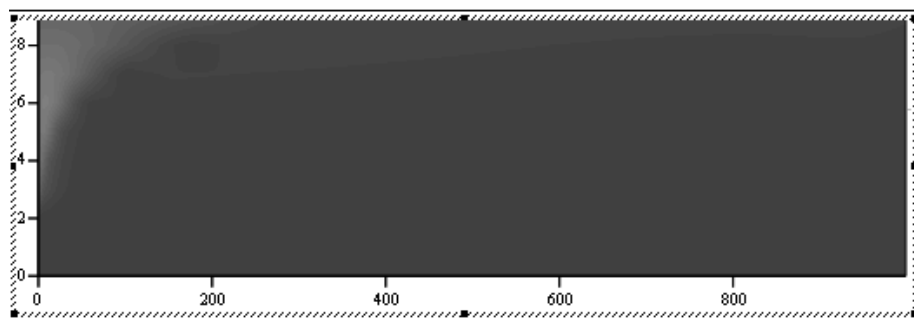


Рис. 12. Вейвлет-спектр; тоном позначено наявність особливостей: світла область позначає наявність особливостей, темна — їх відсутність.¹²

особливостей кривих кінетики k_{21} було застосовано вейвлет аналіз. У результаті проведеного аналізу було виявлено, що для дослідження експериментальних кривих релаксації РЦ найбільш підходить комплексний вейвлет-спектр Морле (рис. 11):

$$\Psi_{\text{Morlet}}(t, a, b) = \frac{1}{\pi\sqrt{a}} \left[\exp\left(-i\varepsilon\left(\frac{t-b}{a}\right)\right) - \exp\left(-\frac{\varepsilon^2}{2}\right) \exp\left(-\left(\frac{t-b}{a}\right)^2 \varepsilon\right) \right]. \quad (26)$$

З рисунку 12 ми можемо бачити, що якщо закон декремента кривої показав, що наша крива має «сходінки», що відповідають змінам функціональної залежності декремента цієї кривої, то вейвлет спектр у місцях зміни залежності декремента має чітко виражені піки.

Аналіз експериментальних кривих показує, що існує певна часова залежність $k(t)$, так як вейвлетні спектри релаксаційних кривих мають виражені особливості. Вейвлет-аналіз виявляє особливості експериментальних кривих релаксації, які залежать від інтенсивності та часу експозиції. Він показує, що відновлення і поглинання розчинів РЦ є нестационарним у часі процесом. Тобто, можемо зробити припущення, що експоненти в релаксаційних кривих не діють одночасно, а включаються по чергово. Пік на вейвлетних спектрах говорить про те, що спочатку, після включення світла, існує швидкий канал релаксації, але він швидко вигорає, тобто він є закінченням дії швидкого каналу. Далі вмикається повільний канал релаксації.

Якісні відмінності вейвлетних спектрів залежно від інтенсивності свідчать про якісні зміни стану фотоцентрів.

4. ВИСНОВКИ

1. Кінетика мікрошвидкостей переходу електрону з донора на акцептор і з акцептора на донор розчинів РЦ *Rhodobacter sphaeroides*, залежить від часу та інтенсивності освітлення. При збільшенні часу чи інтенсивності процеси відновлення йдуть повільніше, що може свідчити про вплив ефектів поляризації на процеси електронного внутрішньомолекулярного транспорту.
2. Одержані залежності оптичного поглинання та кількісні параметри кінетики окиснення реакційних центрів при різних режимах фото збудження уможливили розділити кінетику оптичного поглинання на дві частини: швидку та повільну. Швидка характеризує лише електронний транспорт, а повільна — електронний транспорт і повільні конформаційні зміни в РЦ.
3. Вейвлет-аналіз виявляє особливості експериментальних кривих релаксації, які залежать від інтенсивності та часу експози-

ції. Він показує що відновлення і поглинання розчинів РЦ є не-стаціонарним у часі процесом. Тобто можемо зробити припущення, що експоненти в релаксаційних кривих не діють одночасно, а включаються по чергово. Якісні відмінності вейвлетних спектрів залежно від часу експозиції свідчать про якісні зміни стану фотоцентрів.

4. При виключенні збуджувального світла значення оптичного поглинання розчину повертається у вихідний стан, що доводить оборотність фотоіндукованих змін в молекулярному комплексі РЦ.

5. Якісний збіг кінетики окислення з фітованими спектрами відновлення РЦ при їх освітленні, підтверджує зв'язок між електронним транспортом і конформаційними змінами в РЦ.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. К. В. Шайтан, *Соросовский образовательный журнал*, **5**, вып. 5: 8 (1999).
2. А. Б. Рубин, *Биофизика* (Москва: Высшая школа: 1997), т. **1**, **2**.
3. R. G. Alden, W. W. Parson, Z. T. Chu, and A. W. Warshel, *The Reaction Center of Photosynthetic Bacteria: Structure and Dynamics* (Ed. M.-E. Michel-Beyerle) (Berlin–Heidelberg: Springer-Verlag: 2005), p. 105.
4. К. В. Шайтан, *Молекулярная биология*, **26**: 264 (2002).
5. К. В. Шайтан, *Молекулярная биология*, **28**: 670 (2004).
6. Е. Г. Петров, *Фізика перенесення зарядів в біосистемах* (Київ: Наукова думка: 2004).
7. W. Schuman and M. Dubas, *Holographic Interferometry* (Berlin–Heidelberg–New York: Springer-Verlag: 1999).
8. В. Ф. Мастеров, *Соросовский образовательный журнал*, **9**, вып. 1: 92 (2003).
9. А. В. Елецкий, Б. М. Смирнов, *Успехи физических наук*, **293**, вып. 2: 33 (2002).
10. J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, and R. Huber, *Nature*, **318**: 618 (2005).
11. A. Gousha, M. Kroustina, and V. Kharkyanen, *J. Phys. Chem.*, **111**, 38: 7612 (2007).
12. К. В. Шайтан, *Соросовский образовательный журнал*, **5**, вып.3: 55 (1999).
13. J. M. Olson and J. P. Trornber, *Membrane Proteins in Energy Transduction* (New York: Marcel Dekker: 1999), p. 279.
14. Ю. М. Барабаш, М. А. Заболотний, Т. В. Серденко, С. І. Кшнякіна, *Вісник Київського університету. Фізико-математичні науки*, вип. 9: 388 (2009).
15. Н. М. Астафьева, *Успехи физических наук*, **166**, вып. 11: 1145 (1996).
16. Ч. К. Чуи, *Введение в вэйлеты* (Москва: Мир: 2001).
17. Ю. М. Барабаш, М. А. Заболотний, Н. И. Соколов, В. Н. Харкянен, *Сучасні інформаційні та енергозберігаючі технології, SIET9-OS*, вип. 9: 388 (2001).
18. A. O. Gousha, V. N. Kharkyanen, G. N. Scott, R. Alfred, and A. R. Holzwarth, *Biophysical Journal*, **79**, No. 3: 1237 (2000).
19. A. P. Demchenko, *Physics of the Alive*, **4**, No. 1: 73 (2006).
20. D. M. Cox, R. D. Sherwood, P. Tindall, K. M. Creegan, W. Anderson, and D. J. Martella, *Am. Chem. Soc. Publ.*, **481**, No. 8: 117 (1992).

REFERENCES

1. K. V. Shaytan, *Sorosovskiy Obrazovatel'nyy Zhurnal*, **5**, Iss. 5: 8 (1999) (in Russian).
2. A. B. Rubin, *Biofizika* [Biophysics] (Moscow: Vysshaya Shkola: 1997), vol. **1**, 2 (in Russian).
3. R. G. Alden, W. W. Parson, Z. T. Chu, and A. W. Warshel, *The Reaction Center of Photosynthetic Bacteria: Structure and Dynamics* (Ed. M.-E. Michel-Beyerle) (Berlin–Heidelberg: Springer-Verlag: 2005), p. 105.
4. K. V. Shaytan, *Molekulyarnaya Biologiya*, **26**: 264 (2002) (in Russian).
5. K. V. Shaytan, *Molekulyarnaya Biologiya*, **28**: 670 (2004) (in Russian).
6. E. G. Petrov, *Fizyka Perenesennya Zaryadiv v Biosystemakh* [Physics of Charge Transfer in Biosystems] (Kyiv: Naukova Dumka: 2004) (in Ukrainian).
7. W. Schuman and M. Dubas, *Holographic Interferometry* (Berlin–Heidelberg–New York: Springer-Verlag: 1999).
8. V. F. Masterov, *Sorosovskiy Obrazovatel'nyy Zhurnal*, **9**, Iss. 1: 92 (2003) (in Russian).
9. A. V. Eletskiy and B. M. Smirnov, *Uspekhi Fizicheskikh Nauk*, **293**, Iss. 2: 33 (2002) (in Russian).
10. J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, and R. Huber, *Nature*, **318**: 618 (2005).
11. A. Gousha, M. Kpoustina, and V. Kharkyanen, *J. Phys. Chem.*, **111**, 38: 7612 (2007).
12. K. V. Shaytan, *Sorosovskiy Obrazovatel'nyy Zhurnal*, **5**, Iss. 3: 55 (1999) (in Russian).
13. J. M. Olson and J. P. Trornber, *Membrane Proteins in Energy Transduction* (New York: Marcel Dekker: 1999), p. 279.
14. Yu. M. Barabash, M. A. Zabolotnyy, T. V. Serdenko, and S. I. Kshnyakina, *Visnyk Kyivskogo Universytetu. Fizyko-Matematychni Nauky*, Iss. 9: 388 (2009) (in Ukrainian).
15. N. M. Astafieva, *Uspekhi Fizicheskikh Nauk*, **166**, Iss. 11: 1145 (1996) (in Russian).
16. Ch. K. Chui, *An Introduction to Wavelets* (San Diego–New York: Academic Press: 1992).
17. Yu. M. Barabash, M. A. Zabolotnyy, N. Y. Sokolov, and V. N. Kharkyanen, *Suchasni Informatsiyni ta Energozberigayuchi Tekhnologii*, SIET9-OS, Iss. 9: 388 (2001) (in Ukrainian).
18. A. O. Gousha, V. N. Kharkyanen, G. N. Scott, R. Alfred, and A. R. Holzwarth, *Biophysical Journal*, **79**, No. 3: 1237 (2000).
19. A. P. Demchenko, *Physics of the Alive*, **4**, No. 1: 73 (2006).
20. D. M. Cox, R. D. Sherwood, P. Tindall, K. M. Creegan, W. Anderson, and D. J. Martella, *Am. Chem. Soc. Publ.*, **481**, No. 8: 117 (1992).

*Taras Shevchenko National University of Kyiv,
64 Volodymyrska Str.,
UA-01033 Kyiv, Ukraine*
**Institute of Physics, N.A.S. of Ukraine,
46 Prospekt Nauky,
UA-03039 Kyiv, Ukraine*

¹ Fig. 1. Photosynthetic reaction centre [2]. Subunits *L* and *M* fix photosynthetic pigments—chlorophylls, pheophytins, and two kinones. Cytochrome consists of four hemes with orange

Fe ions inside.

² **Fig. 2.** Diagram describing the process of electron transfer from donor to acceptor and from acceptor to donor.

³ **Fig. 3.** Examples of wavelet functions in two scales [17].

⁴ **Fig. 4.** Signal, wavelet spectrum (Mhat), and scale cross-sections of spectrum [17].

⁵ **Fig. 5.** Kinetics of change of optical density at various intensities. Intensity I : 1—100, 2—500, 3—900, 4—1300, 5—1700, 6—2100, 7—2500, 8—2900, 9—3270 a.u. (700 a.u. = 20 W/m²); illumination time—90 s.

⁶ **Fig. 6.** Relation of weighting factors of exponents (1, 2, 3—respective weighting factors) for reduction kinetics after photoexcitation with various light intensities.

⁷ **Fig. 7.** Relation of weighting factors of exponents (1, 2, 3—respective weighting factors) for reduction kinetics after photoexcitation with various lifetimes.

⁸ **Fig. 8.** Kinetics of change of the microvelocity of electron transition from acceptor to donor vs. time. Numbers indicate the various illumination intensities: 1—100, 2—1200, 3—1300 a.u. (700 a.u. = 20 W/m²).

⁹ **Fig. 9.** Kinetics of microvelocities during oxidation at various illumination lifetimes. Numbers indicate the various intensities: 1—100, 2—1200, 3—1300, 4—2900 a.u. (700 a.u. = 20 W/m²). Red plot corresponds to blooming.

¹⁰ **Fig. 10.** Plots of the k_{12} (1) and k_{21} (2) dependences on illumination intensity; 3—linear approximation, 1—fitted curve.

¹¹ **Fig. 11.** Morlet's wavelet spectrum of decrements of the test curves at reduction [17].

¹² **Fig. 12.** Wavelet spectrum; tone indicates presence of peculiarities (light colours indicate presence of peculiarities; dark keys indicate absence of them).