логия раст. 1989. **36**. № 1. С. 57. [5] Kolber Z., Zehr J., Falkowski P. G.]/ Plant Physiol. 1988. **88**. N 3. P. 923. [6] Herzig R., Falkowski P. G.]/J. Phycol. 1989. **25**. P. 462. [7] Falkowski P. G., Sukenik A., Herzig R.//J. Phycol. 1989. **25**. P. 471. [8] Holtzwarth A. R.//Photochem. Photobiol. 1986. **43**. P. 707. [9] Иванов И. Г., Фадеев В. В.//Изв. АН СССР, сер. биол. 1989. **53**. № 6. С. 882. [10] Бункин А. Ф., Суровегин А. Л.//Океанология. 1986. **26**. № 3. С. 532. [11] Карабашев Г. С. Флюоресценция в океане. Л., 1987. [12] Демидов А. А., Лапшевкова Т. В., Фадеев В. Р. В. и др.//Метеородогия и гидрология. 1988. № 6. С. 62. [13] Климов В. В., Алахвердиев С. И., Пашенко В. З.//Докл. АН СССР. 1978. **242**. № 5. С. 1204 [14] Роwles S. В.//Апп. Rev. Plant Physiol. 1984. **35**. Р. 15. [15] Simpson D. J., Robinson S.//Plant Physiol. 1984. 74. N 3. P. 735. [16] Джасим С. Я., Серов Н. Я., Фадеев В. В. и др.//Квант. электроника. 1991. **18**. № 4. С. 425. [17] Иванов И. Г. Дис. ... канд. физ.-мат. наук. М. (МГУ, физ. фак.), 1987.

Поступила в редакцию 30.10.91

ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 3, ФИЗИКА, АСТРОНОМИЯ. 1992. Т. 33, № 4

УДК 581.132:58.035

ВЕРОЯТНОСТНОЕ ОПИСАНИЕ ЗАМЕДЛЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ ДЛЯ МОДЕЛИ КОМПЛЕКСА РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ ФОТОСИСТЕМЫ 2

А. К. Кукушкин, В. А. Рябов, Е. А. Солдатова

(кафедра биофизики)

Применен вероятностный метод для описания замедленной флуоресценции высших растений. За основу простейшей модели берется комплекс реакционных центров фотосистемы 2, в котором под действием света происходит разделение зарядов. Рассматривается модель, состоящая из пигмента, донора и акцептора электронов с прерванной цепью электронного транспорта с учетом безызлучательного перехода, а также без него. Результаты показывают, что многоэкспоненциальная кинетика затухания и немонотонная кинетика интенсивности замедленной флуоресценции могут возникать в ходе обратных реакций, происходящих на начальных этапах переноса электронов.

Как известно, фотосинтез осуществляют высшие растения, водоросли и некоторые бактерии. Основной смысл этого процесса состоит в трансформации световой энергии в химическую энергию органических молекул. На начальной стадии фотосинтеза энергия света трансформируется и аккумулируется в таких продуктах, как АТФ и НАДФН, а в последующих темновых реакциях АТФ и НАДФН обеспечивают восстановление CO_2 до углеводов и другие биохимические превращения. Изучение механизмов такого высокоэффективного использования энергии света в фотосинтезе играет первостепенную роль для управления этим процессом. Получение результатов возможно на этом пути только при детальном выяснении взаимосвязи первичных процессов фотосинтеза с физиолого-биохимическим состоянием растения как основным фактором, регулирующим общий характер и эффективность фотосинтеза.

В 1951 г. Стрелер и Арнольд обнаружили, что изолированные хлоропласты испускают слабое свечение в течение многих секунд после облучения их видимым светом [1]. Сходство спектров свечения со спектрами флуоресценции показало, что у выделяющих кислород организмов это свечение испускается молекулами хлорофилла *а* при переходе их из первого синглетного возбужденного состояния в основное, т. е. представляет собой замедленную флуоресценцию (ЗФ) хлорофилла. В соответствии с представлением о ЗФ как следствии обращения первичных стадий фотосинтеза [2] возбуждение, ответственное за ЗФ, возникает в реакционном центре фотосистемы 2 (ФС2). Поскольку обратные реакции переноса электрона, отвечающие за ЗФ, происходят в жестких комплексах переносчиков, то для описания этих явлений в работе [3] была предложена кинетическая модель в виде цепи Маркова с конечным числом состояний и непрерывным временем, которая описывается системой линейных дифференциальных уравнений первого порядка:

$$dP_i/dt = \sum_{i=1}^{L} (K_{ji}P_j - K_{ij}P_i); P_i(0) = b_i; \sum_{i=1}^{L} P_i = 1; i, j = 1, \dots, L, (1)$$

где L — число возможных состояний комплекса, $P_i(t)$ — вероятность того, что комплекс находится в состоянии i в момент времени t, k_{ij} — константа скорости переноса электронов, соответствующая переходу между i-м и j-м состояниями, b_i — начальное распределение вероятностей.

В данной работе вероятностный метод применен для описания ЗФ высших растений. Замедленная флуоресценция хлорофилла представляет собой универсальное явление, свойственное как эукариотическим, так и прокариотическим организмам, и обусловлено оно рекомбинацией разделенных зарядов в реакционных центрах фотосинтеза. Исследование ЗФ дает обширную информацию о скоростях реакций прямого и обратного транспорта электронов, эффективности стабилизации поглощенной энергии света, физиологическом состоянии клеток и целых фотосинтезирующих организмов. Интенсивность ЗФ зависит от концентрации в среде СО2, гербицидов, марганца, УФ-облучения и множества других факторов [2, 4]. В некоторых работах предпринимались попытки теоретического рассмотрения ЗФ. Однако, как правило, в этих работах рассматривались стационарные характеристики процесса [5, 6]. Количественной теории кинетики ЗФ пока не существует. В нашу задачу входило сформулировать уравнения, описывающие ЗФ, и решить их на ЭВМ.

За основу простейшей модели для описания ЗФ высших растений берется комплекс РЦ ФС2, в котором под действием света происходит



Рис. 1. Схема возможных 12 состояний комплекса РЦ ФС 2 и возможные переходы между ними

разделение зарядов. Будем считать, что в наиболее простом случае такой комплекс состоит из пигмента (Р), донора (Д) и акцептора электрона (А). Такая модель соответствует РЦ ФС2 с прерванной цепью электронного транспорта (ЦЭТ) на уровне пластохинонов и с добавленными в избытке электронными акцепторами. На рис. 1 представлена схема 12 возможных состояний такого комплекса, а также возможные переходы между ними. ЗФ наблюдается после выключения света, поэтому все световые константы скорости перехода между различными состояниями равны нулю. Для констант остальных переходов вводим следующие обозначения:

Р* _____ Р ___ излучательная дезактивация возбужденного состояния лигмента;

Р*А $\xrightarrow{k_1}$ Р⁺А⁻ — разделение зарядов; ДР⁺ $\xrightarrow{k_2}$ Д⁺Р — восстановление пигмента донором; А⁻ $\xrightarrow{k_3}$ А — уход электрона дальше по ЦЭТ; Д⁺ $\xrightarrow{k_4}$ Д — восстановление вторичного донора.

Приписывая каждому состоянию комплекса определенную вероятность P_i , можно составить систему дифференциальных уравнений, описывающих процессы в комплексе. На рис. 2 дана схема состояний комплекса в случае послесвечения. В дальнейшем будем считать, что разделенные заряды стабилизированы в данном комплексе, т. е. переходы $A^- \rightarrow A$ и $A^+ \rightarrow A$ не происходят; следовательно, константы k_3 и k_4 равны нулю. Это соответствует РЦ ФС2 без электронных акцепторов и доноров. Тогда схему, показанную на рис. 2, можно упростить и представить в виде

¹ДРА
$$\leftarrow k_0$$
 5 ДР*А $\leftarrow k_{-1}k_1$ $\leftarrow k_{-2}k_2$ 3 Д+РА (2)

Для начала рассмотрим процесс последовательного освещения объекта короткими вспышками света для случая, когда нет восстановления пигмента донором:

$$10 \text{ДP}^+\text{A}^- \xleftarrow{k_1 k_{-1}} \boxed{5 \text{ДP}^*\text{A}} \xrightarrow{k_0} \boxed{1 \text{ДPA}}$$
(3)

Учитывая, что в состоянии 1 объект освещался кратковременными вспышками (см. рис. 3), введем в систему уравнений световую константу σ и функцию f(t), отвечающую за режим освещения объекта.



Рис. 2. Схема возможных состояний комплекса РЦ ФС 2 в случае послесвечения

Функция f(t) принимает значение 1 во время освещения объекта, в остальное время она равна нулю. В результате из (1) получаем следующую систему уравнений:

$$dP_{1}/dt = k_{0}P_{5} - \sigma f(t)P_{1},$$

$$dP_{10}/dt = k_{1}P_{5} - k_{-1}P_{10},$$

$$dP_{5}/dt = k_{-1}P_{10} - k_{1}P_{5} - k_{0}P_{5} + \sigma f(t)P_{1}.$$
(4)

Для решения этой системы уравнений применен метод Рунге— Кутта. Расчеты проводились на IBM РС. При этом использовались известные значения констант скоростей переходов:

$$k_0 = 10^9 \text{ c}^{-1}; \ k_1 = 10^{11} \text{ c}^{-1}; \ k_{-1} = 10^8 \text{ c}^{-1}; \ \sigma = 100 \text{ c}^{-1}.$$
 (5)

Основному невозбужденному состоянию соответствует вероятность P_i , состоянию с возбужденным РЦ соответствует вероятность P_5 , а состоянию с первичным разделением заряда — P_{10} . Понятно, что начальные условия для численного решения нашей задачи на ЭВМ в данном случае следующие:

$$P_1 = 1; P_5 = 0; P_{10} = 0.$$
 (6)

Для устранения возможной при столь большом разбросе значений констант (5) потери устойчивости решения системы (4) проведем замену переменных:

$$t = 10^{-9} \tau, \ \tilde{P} = 1 - P_1.$$
 (7)

Ранее упоминалось, что объект в состоянии 1 освещался кратковременными вспышками света. На рис. 3 показана временная схема численного эксперимента, состоящего из последовательности вспышек

10 мкс света с длительностью ис темновой стадией между вопышками 20 мкс. Такая схема соответствует обычной постановке эксперимента по измерению кинетики послесвечения. При этом объект возбуждается вспышками длительностью около 1 мс с частотой около 200 Гц, в промежутках между которыми регистрируется послесвечение. Нами выбраны другие длительности потому, что, как показал предварительный расчет для импульсов большей длительности, уже через 1-2 мкс после начала вспышки величина Р₅ достигала определенного зна-

чения и далее не менялась. Это видно даже на рис. 4, хотя здесь длительность импульса равна 10 мкс. Во время темновой стадии P_5 спадала по экспоненте. Интересно отметить, что после 5-й вспышки (см. рис. 5) в кинетике ЗФ появляется вторая экспонента, т. е. компонента ЗФ со временем затухания порядка 10 мкс. Появление второй экспоненты было зарегистрировано в опытах Ван Беста [7]. После 7-й вспышки вторая экспонента исчезает.

Таким образом, мы получили, что даже в случае простой модели комплекса реакционного центра, не учитывающей сложного строения цепи электронного транспорта, в микросекундном диапазоне существует немонотонная кинетика ЗФ.



Рис. 3. Схема эксперимента. Прямоугольники соответствуют вспышкам света. Длительность вспышки — 10 мкс, темновой стадии — 20 мкс



Рис. 4. Экспоненциальная зависимость ЗФ от времени после первой вспыцики света



Рис. 5. Экспоненциальная зависимость ЗФ от времени после пятой вспышки света. Ясно видны две экспоненты

На следующей стадии рассмотрения процесса 3Φ мы усложнили модель, учтя безызлучательный переход из состояния 10 в состояние 1, как показано на схеме (8):

На системе уравнений (5) это отразилось добавлением в нее члена с константой R_b . В результате получили следующую систему уравнений:

$$dP_{1}/dt = k_{0}P_{5} - \sigma f(t)P_{1} + R_{b}P_{10}, dP_{10}/dt = k_{1}P_{5} - k_{-1}P_{10} - R_{b}P_{10}, dP_{5}/dt = k_{-1}P_{10} - k_{1}P_{5} - k_{0}P_{5} + \sigma f(t)P_{1}.$$
(9)

Решение этой системы проводилось аналогично решению системы (5) и искалось для $R_b=10$, 100 и 1000 с⁻¹. Характер изменения ЗФ во всех четырех случаях (учитывая и $R_b=0$) был одинаков. Так же, как и в предыдущем случае, появлялась вторая экспонента ЗФ после 5-й вспышки, а после 7-й — исчезала. На рис. 6 показано изменение кинетики ЗФ в зависимости от помера вспышки света. На кривой спада ЗФ были выбраны три точки: A, B и C (см. рис. 3), в которых была рассчитана интенсивность ЗФ в зависимости от номера вспышки. На рис. 6 вспышки следовали через 30 мкс, что отмечено точками на этом рисунке. Интенсивность ЗФ рассчитана для двух случаев: константа безызлучательного перехода $R_b=10^3$ с⁻¹ и $R_b=0$. Видно, что величина R_b не сильно влияет на изменение кинетики ЗФ. Так, в течение первых 110—120 мкс (т. е. после первых четырех вспышек) во всех трех случаях A, B и C соответственно.

Похожая немонотонная зависимость интенсивности ЗФ от номера вспышки была обнаружена в работе Ван Беста для 20-мкс компо-



ненты ЗФ [7], а также для быстрой (сотни мкс) и медленной (единицы мс) компоненты ЗФ в работе А. В. Гехмана [8].

Наши результаты показывают, что многоэкспоненциальная кинетика затухания и немонотонная кинетика интенсивности ЗФ могут возникать в ходе обратных реакций, происходящих на начальных этапах переноса электронов. Влияние последующих этапов переноса электронов, а также влияние процессов регуляции фотосинтеза на интенсивность ЗФ мы надеемся рассмотреть в следующих публикациях.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Strehler B. L., Агпоld W.//J. Gen. Physiol. 1951. 34, N 6. P. 809. [2] Рубин А. Б., Кононенко А. А., Пащенко В. З. и др.//Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. 1987. 22. [3] Рубин А. Б., Шинкарев В. П. Транспорт электронов в биологических системах. М., 1984. [4] Моргун В. Н., Григорьев Ю. С., Гаевский Н. А., Гольд В. М.//Биофизика. 1983. 28, № 5. С. 779. [5] Бухов Н. Г., Дамиров Х. Г., Джибладзе Т. Г. и др.//Науч. докл. высшей школы. Биологические науки. 1988. № 4. С. 28. [6] Кукушкин А. К.//Теоретическая и экспериментальная биофизика. Калининград, 1977. Вып. 7. С. 3. [7] Van Best J. А. Thesis. Leiden, 1976. [8] Гехман А. В., Моргун В. Н., Знак Н. Ю., Григорьев Ю. С.//Проблемы современной биологии: Тр. 18 науч. колф. молодых ученых биол. ф-та МГУ. М. (МГУ). Ч. 2. С. 21. Деп. ВИНИТИ № 6653-В 87. М., 1987.

Поступила в редакцию 09.12.91