

ДОСЛІДЖЕННЯ КІНЕТИКИ ФОТОЗБУДЖЕННЯ ТА РЕЛАКСАЦІЇ БІОЛОГІЧНИХ МАКРОМОЛЕКУЛ У ПРОСТОРОВО РОЗПОДІЛЕНИХ СИСТЕМАХ

Теоретично вивчено процес фотозбудження і релаксації фотозбуджених станів у біомакромолекулах видовжених зразків. У цьому випадку світло проходить крізь зразок із суттєвим відхиленням від закону Бугера-Ламберта-Бера. Встановлено ймовірні стаціонарні розподіли інтенсивності світла, що проходить крізь видовжений зразок, новий метод обчислення для дослідження кінетики фотозбудження і релаксації видовжених зразків біологічних молекул. Одержані теоретичні результати можна застосовувати для дослідження процесів зарядового переносу у бактеріальних РЦ і фотозбуджених перебудованій структурі у ФЖП. Вперше встановлено параметри, що характеризують стаціонарні та кінетичні властивості біологічних молекул.

1. Вступ

Відомо, що вивчення оптичних властивостей розчинів та плівок важливих біологічних макромолекул належить до найефективніших методів досліджень їх структурних особливостей та механізмів функціонування. Один із методів базується на тому, що збуджена молекула, яка залишається в цьому стані деякий час, змінює свій спектр поглинання. Зокрема, на деяких характерних для цієї молекули довжинах хвиль (маркерів) відбувається т. зв. вицвітання спектра [1]. Саме ця властивість і використовується, щоб слідкувати за електронним станом макромолекули, що зумовлює зміни її конформаційного стану. Але тривале перебування молекули у збудженому стані може призводити до залежності оптичної густини розчину від інтенсивності збуджуючого світла і, таким чином, відхилення від закону Бугера $I(d) = I_0 \cdot e^{-\epsilon c d}$, де I_0 – інтенсивність падаючої хвилі; d – товщина шару; ϵ – коефіцієнт молярної екстинкції, що залежить від довжини хвилі; c – молярна концентрація поглинаючих молекул. При цьому вважається, що величина поглинання кожного атома речовини весь час залишається сталою. Реально ж при поглинанні світла молекула переходить у новий збуджений стан, запасаючи поглинуту енергію. Доки вона перебуває у цьому стані, її здатність поглинати світло змінюється. Закон Бугера відповідає випадку, коли молекула перебуває у збудженому стані дуже короткий час (як правило, це величина порядку 10^{-8} с), за який імовірно повторного збудження можна знехтувати. Коефіцієнт молярної екстинкції $\epsilon = \alpha \cdot N_A$, де α є молекулярним коефіцієнтом поглинання або ефективним перерізом по-

глинання, що не залежить від концентрації і є характеристикою молекули поглинаючої речовини, а N_A – число Авогадро. За малих значень концентрації c можна збільшити інтенсивність поглинання, збільшуючи товщину поглинаючого шару d .

У цій праці розглядається схема (див. рис. 7), коли в експерименті задіяні два джерела світла. Збуджуюче світло використовується для «керування» електронним станом макромолекул, а тестуюче – для визначення цього стану. Збуджуюче світло проходить перпендикулярно до тестуючого світла, інтенсивність якого майже не впливає на кількість збуджених молекул.

Як правило, при дослідженні біологічних об'єктів не враховують той факт, що оптична густина може мати нелінійний характер. Це справедливо лише в тому разі, коли зразок чи кювета, в якій розміщений розчин, є тонкими, але кількісну оцінку може дати тільки конкретний розрахунок. Однак у праці [2] при дослідженні кінетики фотоокислення молекулярного комплексу 1-ї фотосистеми рослин, де пропонується метод розрахунку молекулярного коефіцієнта поглинання, це питання навіть не обговорюється.

У проведених нами дослідженнях фотоіндукованого переносу електрона через пігментно-білковий комплекс фотосинтезуючих бактерій (т. зв. реакційний центр (РЦ)) у процесі фотосинтезу [3, 4] для збільшення величини поглинання збільшувалась ширина кювети з розчином біологічних молекул. Але процеси релаксації фотозбуджених макромолекул РЦ відбуваються з характерними часовими показниками ~ 1 с і більше. У цьому разі виникає проблема, пов'язана з тим, що інтенсивність збуджуючого світла, яке розповсюджувалося

по ширині кювети, суттєво змінюється вздовж його оптичного шляху й різні макромолекули РЦ перебувають у різних умовах фотозбудження. Оптична густина ϑ стає залежною від інтенсивності збуджуючого світла, а через це – і від положення поглинаючої молекули в кюветі. Аналогічна проблема виникає також під час дослідження оптичних властивостей іншого білка – фотоактивного жовтого протеїну (ФЖП) [5, 6].

При вивченні як стаціонарних, так і кінетичних властивостей біологічних макромолекул означені вище ефекти потребують коректного врахування. Тому в цій праці пропонується метод врахування нелінійного ефекту поглинання світла біологічною речовиною в умовах реального експерименту з розчинами біологічних макромолекул – РЦ та ФЖП.

2. Теорія

2.1. Кінетика фотоіндукованих процесів у біологічних макромолекулах

Реакційний центр можна уявити у вигляді деякої складної білкової матриці зі вбудованими в неї молекулярними групами (редокс-кофакторами), які проявляють донор-акцепторні властивості відносно фотозбудженого електрона. Фотозбуджений електрон з донора-димера бактеріохлорофілу **P** через ряд проміжних акцепторів переноситься на відстань $\sim 30\text{--}40$ Å на первинний хінонний акцептор **Q_A**, а потім стабілізується на вторинному хінонному акцепторі **Q_B**, створюючи різницю потенціалів на фотосинтезуючій мембрані [7]. Враховуючи те, що часом життя фотозбудженого електрона на проміжних акцепторах можна знехтувати, для опису кінетики фотозбудження РЦ часто користуються дворівневою схемою (рис. 1), згідно з якою РЦ перебуває в основному стані (0), що відповідає локалізації електрона на донорі **P** і під дією світла переходить у збуджений стан (1) із фотозбудженням електроном на вторинному хінонному акцепторі **Q_B** [7].

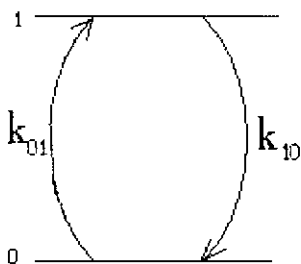


Рис. 1. Спрощена кінетична схема фотоіндукованих електронних переходів в РЦ

Фотоактивний жовтий протеїн – поєднання хромофору і білкової макромолекули, бере

участь у передачі сигналу в бактерії виду *Ectothiorhodospira halophila*. У *trans*-конформації хромофор перебуває в основному стані за відсутності опромінення. Під дією світла хромофор збуджується і в збудженому стані змінює свою конформацію на *cys*-форму. Релаксація збудженого хромофору у *cys*-формі відбувається через ряд короткоживучих проміжних станів і зміну конформації білкової глобули – анфолдинг. Подальша релаксація до основного стану відбувається через термічний перехід хромофору з *cys*- в *trans*-конформацію та рефолдинг білкової макромолекули. Останні дослідження доводять, що *trans*-*cys* ізомеризація хромофору відбувається протягом фотоциклу, утворюючи основу для фотохімічних процесів. Повільні стадії фотоциклу жовтого протеїну можна також подати дворівневою схемою, згідно з якою основний стан – 0 відповідає незбудженому хромофору в *trans*-конформації, а збуджений світлом стан – 1 відповідає *cys*-конформації збудженого хромофору [8, 9]; k_{01} та k_{10} константи швидкості переходів електрона, відповідно, між станами 0 і 1.

Якщо позначити заселеність станів 0 та 1 на рис. 1 $n_0(t)$ та $n_1(t)$ відповідно, то рівняння, що описує їх еволюцію, матиме вигляд:

$$\frac{dn_0(t)}{dt} = -k_{01} \cdot n_0(t) + k_{10} \cdot n_1(t),$$

$$n_1(t) = 1 - n_0(t),$$
(1)

де k_{01} і k_{10} – константи швидкості фотозбудження та релаксації відповідно, причому $k_{01} = \alpha I$, де $\alpha = \frac{\varepsilon}{N_A}$ – молекулярний коефіцієнт поглинання.

Розв'язки цих рівнянь для описання процесу фотозбудження за початкових умов $n_0(0) = 1$, $n_1(0) = 0$ є:

$$\begin{cases} n_0(t) = n_0^{st} + [1 - n_0^{st}] \cdot e^{-(k_{01} + k_{10})t} \\ n_1(t) = n_1^{st} (1 - e^{-(k_{01} + k_{10})t}), \end{cases}$$
(2)

де

$$n_0^{st} = \frac{k_{10}}{k_{10} + k_{01}}, \quad n_1^{st} = \frac{k_{01}}{k_{10} + k_{01}},$$
(3)

а процесу її релаксації ($I = 0$) після досягнення стаціонарного стану (початкові умови:

$$n_0(0) = \frac{k_{01}}{k_{10} + k_{01}}, \quad n_1(0) = \frac{k_{10}}{k_{10} + k_{01}}), \quad \text{відповідає}$$

вираз:

$$n_0(t) = 1 - \frac{k_{01}}{k_{10} + k_{01}} \cdot e^{-k_{10}t},$$

$$n_1(t) = \frac{k_{10}}{k_{10} + k_{01}} \cdot e^{-k_{10}t}.$$
(4)

Дослідження кінетики фотозбудження молекул ґрунтується на тому факті, що їх поглинання в основному і збудженому станах може суттєво відрізнитись на характерній для цього типу молекул довжині хвилі λ , тобто для оптичної густини зразка, що визначається експериментально, $A(t) = [\epsilon_0 \cdot n_0(t) + \epsilon_1 \cdot n_1(t)] \cdot c \cdot d + A_0$, де ϵ_0 , ϵ_1 – молярні коефіцієнти поглинання в основному та збудженому станах відповідно, A_0 – оптична густина зразка, не пов'язана з фотоактивними молекулами.

Враховуючи, що $\epsilon_0 = \epsilon$ і $\epsilon_1 = 0$, у відсутності збуджуючого світла $A(0) = \epsilon \cdot c \cdot d + A_0$, а в умовах фотозбудження молярний коефіцієнт поглинання $\epsilon = c \cdot n_0(t)$ і, відповідно, оптична густина

$$A(t) = \epsilon \cdot n_0(t) \cdot c \cdot d + A_0 = \epsilon [1 - n_1(t)] \cdot c \cdot d + A_0, \text{ звідки } n_1(t) = -\frac{A(t) - A(0)}{A(0) - A_0} = -\frac{\Delta A(t)}{A(0) - A_0}.$$

Відомо [10, 11], що молекули РЦ можуть перебувати в різних конформаційних станах, тому для кількісного аналізу реального експерименту кінетичні криві апроксимуються набором кількох експонент за допомогою «flexible access method» [12, 13], показники та вагові множники яких знаходять методом мінімізації середньоквадратичної похибки. У цій праці використовувалась апроксимація кінетичних кривих сумою трьох експонент з ваговими коефіцієнтами. Таким чином, для гілок збудження $\Delta A_{rise}(I, t)$ і релаксації $\Delta A_{dic}(I, t)$, відповідно, одержимо:

$$\Delta A_{rise}(I, t) = \sum_{i=1,2,3} \Delta A_{max}^i \frac{\alpha_i \cdot I}{\alpha_i \cdot I + k_{rel}^i} \cdot (1 - e^{-(\alpha_i \cdot I + k_{rel}^i)t}), \quad (5)$$

$$\Delta A_{dic}(I, t) = \sum_{i=1,2,3} \Delta A_{rise}^i(I, t_{exp}) \cdot e^{-k_{rel}^i(t - t_{exp})}, \quad t \geq t_{exp}. \quad (6)$$

Знайдені в результаті зіставлення виразів (5–6) з експериментом параметри k_{rel}^i , α_i та ΔA_{max}^i , ΔA_{rise}^i визначають кінетику фотозбудження та релаксації молекул, що служить ефективним методом вивчення фізичних механізмів їх функціонування.

Але вирази (5–6) не враховують розподілу інтенсивності збуджуючого світла вздовж його оптичного шляху, що, як було сказано вище, є важливим в умовах реального експерименту. Це пов'язано з необхідністю враховувати розподіл інтенсивності збуджуючого світла вздовж кювети, а разом з тим й індукований цим світлом розподіл оптичної густини.

2.2. Стаціонарне поглинання світла в середовищі з фотоактивними макромолекулами

Розглянемо випадок стаціонарного проходження світла через кювету довжиною L , на яку з одного боку (у цьому разі зліва) нормально падає збуджуюче світло інтенсивності I_0 (рис. 2).



Рис. 2. Схема проходження збуджуючого світла крізь кювету

Тоді, згідно з описаною вище дворівневою схемою, для зміни інтенсивності поглинаючого світла dI на ділянці dz можна записати рівняння:

$$dI(z) = -\epsilon \cdot c \cdot I(z) \cdot dz \cdot \frac{k_{rel}}{\alpha \cdot I(z) + k_{rel}}, \quad (7)$$

де $\frac{k_{rel}}{\alpha \cdot I(z) + k_{rel}}$ – імовірність знаходження молекули в основному стані в точці z . (Імовірність поглинання в збудженому стані вважається рівною нулю.)

Розв'язок рівняння (7) можна подати у вигляді:

$$z = \frac{1}{\epsilon \cdot c} \left(\ln \frac{I_0}{I(z)} + \alpha \frac{I_0 - I(z)}{k_{rel}} \right), \quad (8)$$

де I_0 – інтенсивність падаючої хвилі. Першому доданку в правій частині (8) відповідає звичайний закон Бугера $I_1(z) = I_0 \cdot e^{-\epsilon \cdot c \cdot z}$.

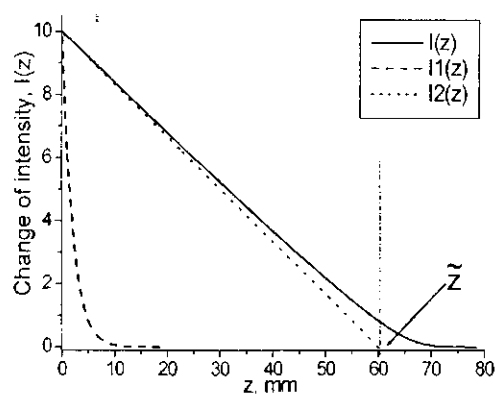


Рис. 3. Зміна інтенсивності світла вздовж кювети. Крива $I_1(z)$ відповідає зміні згідно із законом Бугера, крива $I_2(z)$ описує лінійний закон зміни інтенсивності світла, а крива $I(z)$ є узагальнюючою. $\epsilon \cdot c = 0,5$, $k_{rel} = 1 \text{ с}^{-1}$, $I_0 = 10$ а.о.д., $\alpha = 3$

другому – лінійний закон $I_2(z) = I_0 - \varepsilon \cdot c \cdot z \frac{k_{rel}}{\alpha}$.

Суцільною кривою (рис. 3) показано розв'язок з урахуванням обох доданків. Із рис. 3 видно, що визначальним для встановлення ролі кожного з доданків є параметр

$$\tilde{z} = \frac{\alpha \cdot I_0}{\varepsilon \cdot c \cdot k_{rel}}. \quad (9)$$

Для $z \ll \tilde{z}$ ми спостерігаємо лінійний закон зменшення інтенсивності; для $z \gg \tilde{z}$ зміну інтенсивності за законом Бугера.

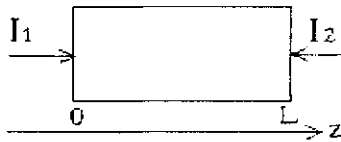


Рис. 4. Схема проходження світла крізь кювету

Розглянемо стаціонарне проходження світла для випадку $z \ll \tilde{z}$, коли на кювету з обох боків нормально падає світло однакової інтенсивності I_0 (рис. 4). Якщо зміну інтенсивності світла, що падає зліва, можна записати як $I_1(z) = I_0 - \varepsilon \cdot c \cdot z \frac{k_{rel}}{\alpha}$, а зміну інтенсивності світла, що падає справа, як $I_2(z) = I_0 - \varepsilon \cdot c \cdot \frac{k_{rel}}{\alpha} (L - z)$, то сумарна інтенсивність світла у точці z мала б значення:

$$I(z) = I_1(z) + I_2(z) = 2I_0 \left(1 - \frac{L \cdot \varepsilon \cdot c \cdot k_{rel}}{2I_0 \alpha} \right), \quad (10)$$

$$\begin{cases} z = \frac{1}{\varepsilon \cdot c} \left(\ln \frac{I_0}{I_1(z)} + \alpha \frac{I_0 - I_1(z)}{k_{rel}} + \alpha \frac{I^2\left(\frac{L}{2}\right)}{4k_{rel}} \left(\frac{1}{I_1(z)} - \frac{1}{I_0} \right) \right) \\ L - z = \frac{1}{\varepsilon \cdot c} \left(\ln \frac{I_0}{I_2(z)} + \alpha \frac{I_0 - I_2(z)}{k_{rel}} + \alpha \frac{I^2\left(\frac{L}{2}\right)}{4k_{rel}} \left(\frac{1}{I_2(z)} - \frac{1}{I_0} \right) \right) \end{cases} \quad (12)$$

Для визначення константи $I\left(\frac{L}{2}\right)$ вико-

ристаємо той факт, що в точці $z = \frac{L}{2}$ сумарна інтенсивність світла $I\left(\frac{L}{2}\right) = 2I_1\left(\frac{L}{2}\right) = 2I_2\left(\frac{L}{2}\right)$ мінімальна. Підставляючи значення для $I\left(\frac{L}{2}\right)$ в перше з рівнянь (12) і розглядаючи його в точці $z = \frac{L}{2}$, отримуємо рівняння для $I\left(\frac{L}{2}\right)$

а значить, кювета була б освітлена рівномірно з ослабленням збуджуючого світла $2I_0$ на величину $\varepsilon \cdot c \cdot z \frac{k_{rel}}{\alpha}$.

Проте вираз (10) не враховує того, що коефіцієнт поглинання світла в точці z залежить від сумарної інтенсивності $I(z) = I_1(z) + I_2(z)$. Для випадку, коли на кювету з обох боків падає збуджуюче світло, рівняння для зміни інтенсивності світла матиме вигляд:

$$\begin{cases} dI_1(z) = -\varepsilon \cdot c \cdot dz \frac{I_1(z) \cdot k_{rel}}{\alpha \cdot I_1(z) + \alpha \cdot I_2(z) + k_{rel}} \\ dI_2(z) = -\varepsilon \cdot c \cdot dz \frac{I_2(z) \cdot k_{rel}}{\alpha \cdot I_1(z) + \alpha \cdot I_2(z) + k_{rel}} \end{cases} \quad (11)$$

з граничними умовами: $I_1(0) = I_2(L) = I_0$. Помноживши перше з рівнянь (11) на $I_2(z)$ а друге на $I_1(z)$ та просумувавши результати, маємо:

$$I_1(z) \cdot I_2(z) = \frac{I^2\left(\frac{L}{2}\right)}{4} = const,$$

де $I\left(\frac{L}{2}\right)$ – сумарна інтенсивність збуджуючого світла у середній точці кювети (тут враховано, що $I_1\left(\frac{L}{2}\right) = I_2\left(\frac{L}{2}\right) = \frac{1}{2} I\left(\frac{L}{2}\right)$). Підставляючи $I_2(z) = \frac{I^2\left(\frac{L}{2}\right)}{4I_1(z)}$ в перше рівняння, а $I_1(z) = \frac{I^2\left(\frac{L}{2}\right)}{4I_2(z)}$ в друге та інтегруючи отримані вирази з урахуванням граничних умов, маємо:

у вигляді:

$$\begin{aligned} \varepsilon \cdot \frac{I^2\left(\frac{L}{2}\right)}{4} \frac{L}{2} &= \ln \left(\frac{2I_0}{I\left(\frac{L}{2}\right)} \right) + \\ &+ \alpha \frac{I_0 - \frac{1}{2} I\left(\frac{L}{2}\right)}{k_{rel}} + \alpha \frac{I^2\left(\frac{L}{2}\right)}{4k_{rel}} \left(\frac{2}{I\left(\frac{L}{2}\right)} - \frac{1}{I_0} \right). \end{aligned} \quad (13)$$

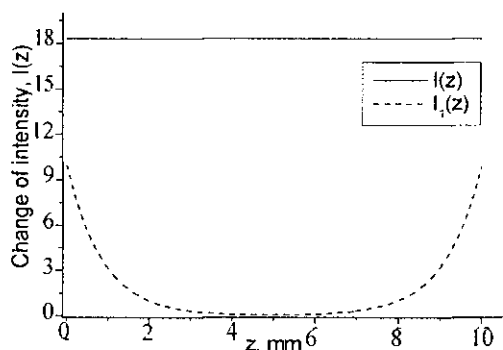


Рис. 5. Зміна інтенсивності світла вздовж кювети. Крива $I(z)$ відповідає випадку «просвітлення» зразка, а крива $I_1(z)$ – закону Бугера. $\varepsilon \cdot c = 0,5$, $k_{rel} = 1 \text{ с}^{-1}$, $I_0 = 10$ а.п. од., $\alpha = 3$, $L = 10$ мм

Оскільки ми шукаємо розв'язок, що відповідає «просвітленню» зразка, визначимо його кількісну міру за допомогою параметра

$$\eta = \frac{2I_0 - I\left(\frac{L}{2}\right)}{2I_0}, \text{ що відповідає максимальному}$$

відносному зменшенню інтенсивності в кюветі у точці $\frac{L}{2}$ за рахунок поглинання. Вважаючи, що $\eta \ll 1$, розв'язок рівняння (13) отримуємо у вигляді:

$$I^2\left(\frac{L}{2}\right) \approx 4I_0^2(1 - 2\eta) = 4I_0^2\left(1 - \frac{L}{2\bar{z}}\right), \quad (14)$$

$$\eta \approx \frac{\varepsilon \cdot c \cdot L \cdot k_{rel}}{2\alpha \cdot I_0} = \frac{L}{2\bar{z}} \ll 1.$$

У цьому наближенні розподіл сумарної інтенсивності вздовж кювети є константою і визначається виразом:

$$I(z) \approx 2I_0 \left(1 - \frac{\varepsilon \cdot c \cdot L}{2} \cdot \frac{k_{rel}}{\alpha \cdot I_0}\right). \quad (15)$$

Параметр η є визначальним для встановлення характеру кривої розподілу інтенсивності збуджуючого світла в кюветі. У випадку $\eta \ll 1$ ($L \ll 2\bar{z}$) ми спостерігаємо значне просвітлення зразка. Цей ефект може бути досягнутий у разі, коли $I_0 \gg k_{rel}$.

Таким чином, зменшення інтенсивності збуджуючого світла за рахунок поглинання зразка є

$$\Delta I = 2I_0 - I = \varepsilon \cdot c \cdot L \cdot \frac{k_{rel}}{\alpha}, \text{ а відносне зменшення}$$

$\frac{\Delta I}{2I_0} = \varepsilon \cdot c \cdot L \cdot \frac{k_{rel}}{2\alpha \cdot I_0} \ll 1$. Точніший вираз, що враховує поправки до (15) і містить залежність від точки z вздовж кювети, має вигляд:

$$I(z) = \frac{1}{\alpha} \sqrt{\left(\varepsilon \cdot c\right)^2 \left(\frac{k_{rel}}{\alpha}\right) \cdot (L - z)^2 + 4I_0 \left(I_0 - \varepsilon \cdot c \cdot L \cdot \frac{k_{rel}}{\alpha}\right)} \quad (16)$$

і відображений суцільною кривою на рис. 5. Пунктирною лінією показано зміну інтенсивності світла згідно з законом Бугера.

3. Моделювання процесу нестационарного поглинання світла в середовищі з фотоактивними молекулами

Для визначення кінетичних параметрів макромолекул необхідно враховувати ефект зміни коефіцієнта поглинання не тільки вздовж оптичного шляху, а й у часі. Інтенсивність світла I у кожен момент часу t залежить від розподілу коефіцієнта поглинання вздовж оптичного шляху збуджуючого світла. Формула (5) набуває вигляду:

$$\Delta A(t) = \Delta A_{\max} \times \int_0^L \frac{\alpha \cdot I(t, z)}{\alpha \cdot I(t, z) + k_{rel}} \cdot \left[1 - e^{-(\alpha \cdot I(t, z) + k_{rel})t}\right] \frac{dz}{L}, \quad (17)$$

де $I(t, z)$ визначає розподіл інтенсивності в момент часу t в точці z , який є добутком $I(t, z) = I_0 Y(t, z)$ інтенсивності падаючої хвилі I_0 на коефіцієнт пропускання

$$Y(t, z) = \left(e^{-\int_0^z \vartheta(t, z') dz'} + e^{-\int_0^{L-z} \vartheta(t, z') dz'} \right), \quad (18)$$

де

$$\vartheta(t, z) = \varepsilon \cdot c \left[1 - \frac{\alpha \cdot I(t, z)}{\alpha \cdot I(t, z) + k_{rel}} \left(1 - e^{[\alpha I(t, z) + k_{rel}]t} \right) \right] \quad (19)$$

у кожен момент часу t в свою чергу залежить від розподілу інтенсивності світла вздовж зразка. Тому справедливим є інтегральне рівняння для розподілу інтенсивності $I(t, z)$:

$$I(t, z) = I_0 \left(\frac{e - \varepsilon \cdot c \int_0^z \left[1 - \frac{\alpha \cdot I(t, z')}{\alpha \cdot I(t, z') + k_{rel}} (1 - e^{-[\alpha \cdot I(t, z') + k_{rel}] t}) \right] dz'}{e - \varepsilon \cdot c \int_0^{L-z} \left[1 - \frac{\alpha \cdot I(t, z')}{\alpha \cdot I(t, z') + k_{rel}} (1 - e^{-[\alpha \cdot I(t, z') + k_{rel}] t}) \right] dz'} \right) + e. \quad (20)$$

Нижче наведено процедуру, яка дозволяє знайти числовий розв'язок рівняння (20) за умови, що $\frac{1}{I(t, z)} \frac{dI(t, z)}{dt} \ll \frac{1}{\vartheta(t, z)} \frac{d\vartheta(t, z)}{dt}$ і швидкість зміни інтенсивності збуджуючого світла набагато менша від швидкості зміни густини коефіцієнта поглинання $\vartheta(t, z)$. Розрахунок показує, що ця умова виконується, коли $\varepsilon \cdot c \cdot l \ll 1$ («темнове» поглинання мале). У цьому разі можна вибрати деякий короткий проміжок часу Δt (який підбирається із умов оптимізації процедури) для дискретизації змінної часу: $t_n = \Delta t \cdot n$. Значення коефіцієнта $\vartheta(t_n, z)$ в рамках даної визначається через коефіцієнт пропускання (18), який залежить від розподілу $\vartheta(t_{n-1}, z)$ в попередній момент часу t_{n-1} .

Очевидно, що поступово, по мірі фотозбудження центрів, оптична густина зразка $\vartheta(t_n, z)$ буде змінюватися, причому величина цих змін у кожній точці кювети буде залежати від інтенсивності фотозбудження в цій точці. Множник

$$\frac{\alpha \cdot I(t_{n-1}, z)}{\alpha \cdot I(t_{n-1}, z) + k_{rel}} \cdot (1 - e^{-[\alpha \cdot I(t_{n-1}, z) + k_{rel}] t_n}), \quad \text{що}$$

визначає локальну кількість збуджених центрів, є малим параметром, який забезпечує побудову послідовної процедури пошуку розв'язку рівняння (20).

У випадку, коли $k_{rel} \gg \alpha \cdot I$, $\vartheta(t, z) \approx \vartheta$, справедливим є закон Бугера. В іншому випадку, що розглядається в цій статті, оптичну густину $\vartheta(t_n, z)$ знаходимо згідно з виразом (19), вважаючи, що при $n = 0$ в момент часу $t_0 = 0$ $I(t_0, z) = 0$, тоді для $n = 1$ маємо:

$$\begin{aligned} \vartheta(t_1, z) &= \vartheta, \quad Y(t_1, z) = [e^{-\vartheta z} + e^{-\vartheta(L-z)}] \\ \Delta A(t_1) &= \Delta A_{\max} \times \\ &\times \int_0^L \frac{\alpha \cdot I_0 \cdot Y(t_1, z)}{\alpha \cdot I_0 \cdot Y(t_1, z) + k_{rel}} \times \\ &\times [1 - e^{-(\alpha \cdot I_0 \cdot Y(t_1, z) + k_{rel}) t_1}] \frac{dz}{L}. \end{aligned} \quad (21)$$

За допомогою ітераційної процедури (17–19) обчислюють величини $\vartheta(t_n, z)$, $Y(t_{n-1}, z)$ і $\Delta A(t_n)$ в наступні проміжки часу. За цією методикою, зокрема, було обчислено розподіл інтенсивності світла вздовж кювети різної довжини та зміну коефіцієнта оптичного поглинання – $\Delta A(t)$ в процесі фотозбудження.

На рис. 6 (а, б) відображено розподіл інтенсивності світла вздовж кювети товщиною 6 мм при інтенсивності фотозбудження $I = 3,75$ мВт/см². Рис. 6 (а) відповідає випадку швидкої релаксації фотозбудження – $k_{rel} = 5$ с⁻¹, а рис. 6 (б) – більш повільній константі релаксації – $k_{rel} = 0,5$ с⁻¹. Для порівняння на рис. 6 (а, б) показано розподіл інтенсивності збуджуючого світла за законом Бугера (штрихпунктирна крива) та для двох різних значень параметра α . Важливим є співвідно-

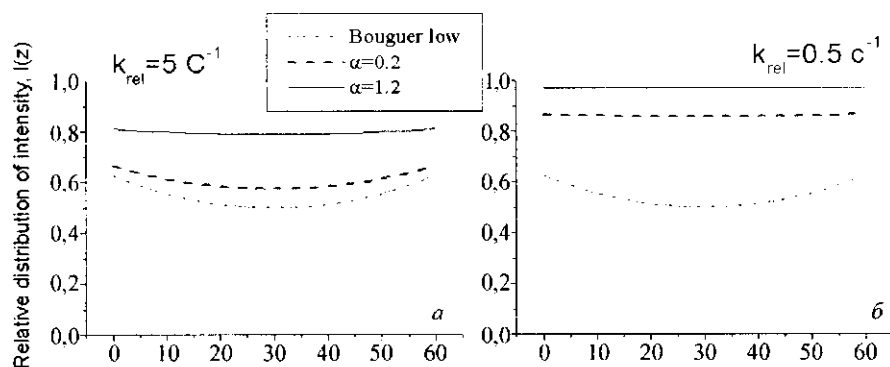


Рис. 6 (а, б). Розподіл інтенсивності світла вздовж кювети товщиною 6 мм ($\alpha = 1,2$ – суцільна крива, $\alpha = 0,2$ – пунктирна крива і штрихпунктирна крива – згідно з законом Бугера)

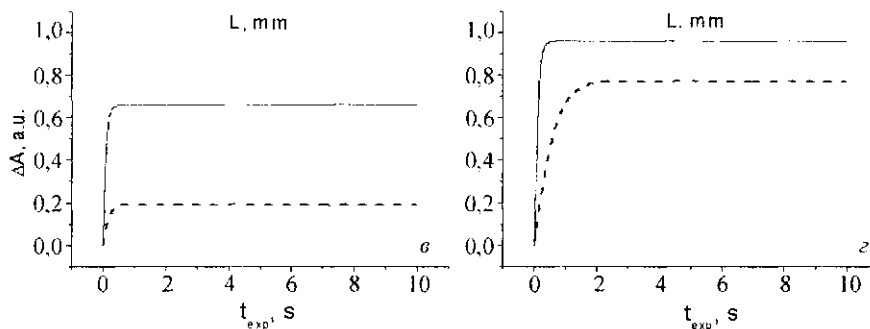


Рис. 6 (а, б). Зміна оптичного поглинання зразка при фотозбудженні ($\alpha = 1,2$ – суцільна крива, $\alpha = 0,2$ – пунктирна крива)

шення між константами швидкості переходів електрона, відповідно, між станами 0 і 1 – k_{01} та k_{10} . Оскільки $k_{01} = \alpha \cdot I$, то важливим є значення параметра α при конкретному значенні інтенсивності світла. Для константи рекомбінації $k_{rel} = 5 \text{ с}^{-1}$ при значенні $\alpha = 1,2$, $k_{01} > k_{10}$ і ми спостерігаємо «просвітлення» зразка ($\eta = 0,027$). Для константи рекомбінації $k_{rel} = 5 \text{ с}^{-1}$ при значенні $\alpha = 0,2$, $k_{01} < k_{10}$ ($\eta = 0,137$) і вигляд кривої для зміни інтенсивності світла подібний до закону Бугера (рис. 6, а). Для константи рекомбінації $k_{rel} = 0,5 \text{ с}^{-1}$ при значенні $\alpha = 1,2$ і для $\alpha = 0,2$, $k_{01} > k_{10}$ і спостерігається «просвітлення» зразка ($\eta \approx 0$ і $\eta = 0,0115$ відповідно), що показано на рис. 6 (б).

Рис. 6 (а, б) показує зміну оптичного поглинання зразка, параметри якого: $k_{rel} = 5 \text{ с}^{-1}$ (рис. 5, а), $k_{rel} = 0,5 \text{ с}^{-1}$ (рис. 5, б) для двох значень параметра α .

Легко бачити, що при реальних значеннях вищенаведених параметрів біологічних макромолекул формула (5) справедлива, коли розглядати зразок товщиною в кілька міліметрів. Для зразків товщиною порядку сантиметра і більше слід враховувати нерівномірність коефіцієнта поглинання вздовж шляху збуджуючого світла. Описана процедура дає змогу знаходити параметри системи з урахуванням усіх нелінійних ефектів, що виникають у зразку під час проходження крізь нього збуджуючого світла, і буде використана для цього у розділі 5.

4. Експериментальна установка

Для проведення експериментів використовувався програмно-апаратний комплекс для дослідження біомолекулярних систем з фотопереносом заряду. Розроблений комплекс призначений для вимірювання оптичного поглинання в розчинах біологічних речовин. Комплекс, створений на базі ПК IBM з вбудованою платою E-1050 системи збору цифрової й аналогової інформації, містить у собі три окремих модулі розміром $15 \times 15 \times 10 \text{ см}$.

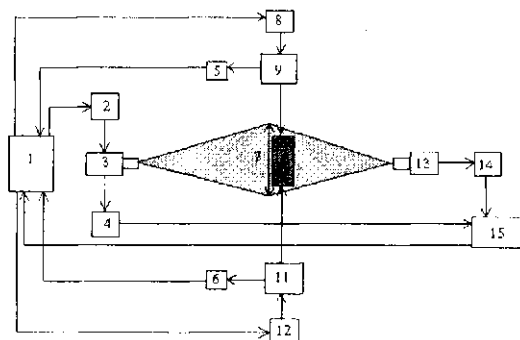


Рис. 7. Блок-схема установки: 1 – ПК, 2 – канал формування імпульсу збудження, 3 – система зі світлодіодами, 4 – канал вимірювання імпульсу збудження, 5, 6 – канали вимірювання імпульсу збудження, 7 – фокусувальна лінза, 8, 12 – канали формування імпульсу детектування, 9, 11 – набір світлодіодів, 10 – фотодіод, 13 – фотоприймач з підсилювачем, 14 – детектор з підсилювачем, 15 – канал попередньої обробки

Він дає змогу вимірювати оптичне поглинання розчинів у діапазоні величин $0-1 \pm 0,002$ на довжині хвилі $430 \pm 30 \text{ нм}$ (для фотоактивного жовтого протеїну) і на довжині хвилі $870 \pm 30 \text{ нм}$ (для реакційних центрів). Особливістю даного комплексу є використання зондувального світла низької інтенсивності ($0,3 \text{ мкВт/см}^2$), модульованого частотою 5 кГц , а також застосування додаткового оптичного каналу для підсвічування розчинів. Це підсвічування приводить до вицвітання спектральної лінії на даній довжині хвилі досліджуваних розчинів. Вона здійснюється на цій самій довжині хвилі й може регулюватися в діапазоні інтенсивностей від 0 до 5 мВт/см^2 відповідно до програмного забезпечення експерименту. Як джерело зондувального й збудливого імпульсів світла використовується набір з 10 світлодіодів з максимальною потужністю до 10 мВт кожний. Комплекс складається з оптичного блоку і блоку попередньої обробки сигналів з цифровою індикацією результатів вимірювання (рис. 7). Він дає змогу проводити дослідження в автономному режимі під керуванням ПК без особистої участі оператора. З його допомогою були одержані

залежності зміни оптичного поглинання розчинів РЦ, ФЖП у різних режимах збудливого світла.

Опромінення зразка проводилось прямокутними імпульсами світла різної тривалості від 1 до 900 с. Максимальна інтенсивність світла $I_{\max} = 3$ мВт/см². Інтенсивність світла регулювалася з кроком у 100 відносних одиниць від 0 до 800 відн. од. протягом усього часу експозиції зразка. Крок дискретизації був змінним. Фаза збудження та початкова фаза релаксації вимірювалися з кроком 0,01 с, далі крок змінювався (0,1–1 с) залежно від умов тривалості запису. Фонове значення поглинання зразка визначалося без фотоактивації. Після того як внаслідок релаксації фотозбудженого стану поточна величина поглинання зразка наближалася до фоновому значення, зразок витримували у темряві заданий час і операція фотозбудження за іншої інтенсивності повторювалася. Таким чином було отримано серію вимірів для двох зразків: фотоактивного жовтого протеїну та реакційних центрів пурпурових бактерій.

Ширина кювети для розчину фотоактивного жовтого протеїну була 2,5 см, а для розчину реакційних центрів – 1 см.

5. Результати

Для дослідження кінетичних характеристик системи, що не зазнала перебудов унаслідок актив фотозбудження («темнових» характеристик), було проведено серію вимірів коефіцієнта оптичного поглинання за тривалості експозиції 5 с і зміні інтенсивності від 0 до 800 відн. од. (рис. 8). Питання про обґрунтованість такого вибору вирішувалося на основі порівняння результатів експерименту з розрахунками для системи з фіксованою структурою згідно з наведеною вище теоретичною моделлю.

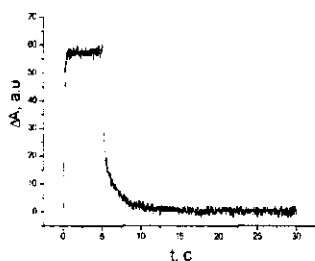


Рис. 8. Динаміка фотозбудження та релаксації макромолекул з часом

В результаті апроксимації експериментально отриманих кривих темрової релаксації при різних інтенсивностях за допомогою формули (6) були визначені константи швидкості рекомбінації.

Максимальні амплітуди $\Delta A'_{\max}$ і коефіцієнт α визначалися з динаміки коефіцієнта оптичного поглинання при фотозбудженні (рис. 8, рис. 9).

Для фотоактивного жовтого протеїну проведені розрахунки дають змогу означити систему, що перебувала під опроміненням різної інтенсивності протягом 5 с, як таку, що є стабільною й описується параметрами (1*), наведеними в таблиці. У таблиці ми навели дані, одержані з урахуванням розподілу інтенсивності світла вздовж його оптичного шляху та згідно з законом Бугера.

Результати обробки серії вимірів разом із експериментальними даними подані на рис. 9. Очевидна відмінність отриманих даних за теорією, згідно з якою світло поглинається за законом Бугера (2*), від експериментальних даних дає змогу зробити висновок, що для систем, які можна описати за допомогою нашої моделі, слід враховувати нелінійний розподіл інтенсивності світла вздовж оптичного шляху.

Для оцінки розмірів кювети можна скористатися формулою (9). Для ФЖП слід брати кювету довжиною до 3 мм, щоб світло розподілялося рівномірно.

За допомогою описаної вище ітераційної процедури розрахунки розподілу інтенсивності збуджуючого світла вздовж кювети для системи, що описується параметрами, наведеними у таблиці, дають змогу встановити, що рівномірний розподіл світла по зразку слід враховувати для кювет товщиною понад 2 мм, що узгоджується з аналітичною оцінкою.

Систему реакційних центрів пурпурових бактерій можна описати за допомогою нижче-описаних параметрів, що наводяться в таблиці (1*). Для порівняння подасмо дані, одержані згідно з теорією, що не враховує розподіл інтенсивності збуджуючого світла вздовж кювети.

	$k_{\text{fast}}, \text{с}^{-1}$	$\Delta A'_{\max}$	$k_{\text{slow1}}, \text{с}^{-1}$	$\Delta A'_{\max}$	$k_{\text{slow2}}, \text{с}^{-1}$	$\Delta A'_{\max}$	α_1	α_2	α_3
1*	6	50	0,0012	125	0,014	9	0,085	0,085	0,085
2*	6	100,15	0,0012	146,25	0,014	10,36	0,0067	0,045	0,16

1* – параметри системи визначалися за формулою (17) з урахуванням розподілу інтенсивності збуджуючого світла вздовж його оптичного шляху;

2* – параметри системи визначалися за формулою (5), яка не враховує розподіл інтенсивності збуджуючого світла вздовж кювети.

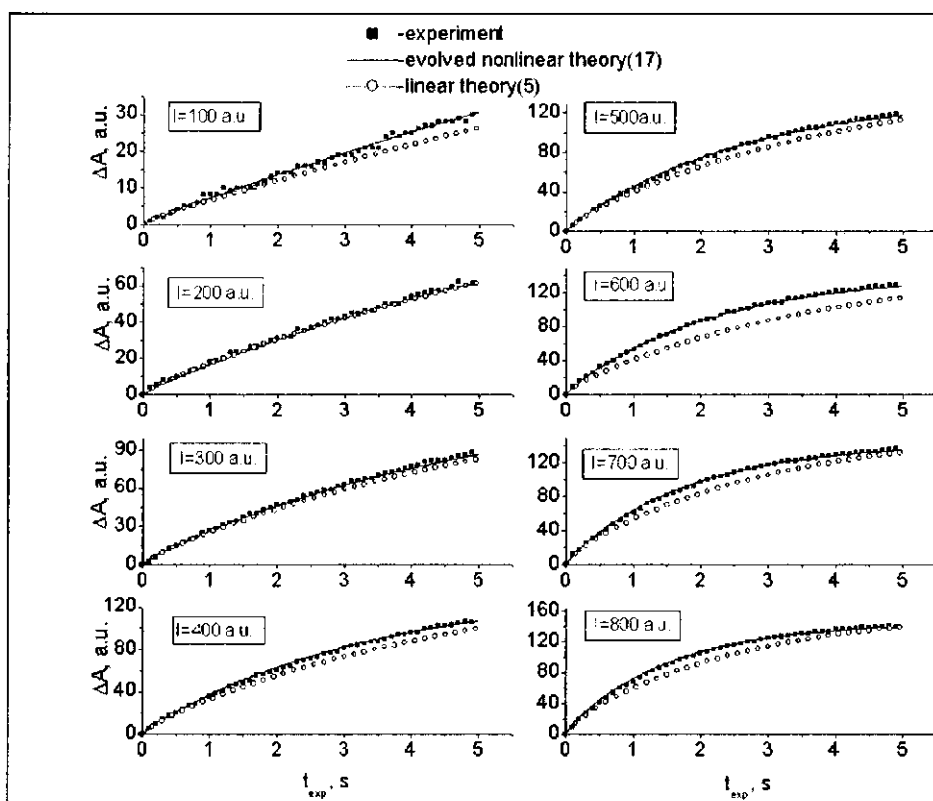


Рис. 9. Динаміка зміни оптичного поглинання фотоактивного жовтого протеїну при фотозбудженні

	k_{fast}, c^{-1}	ΔA_{max}^{fast}	k_{slow1}, c^{-1}	ΔA_{max}^{slow1}	k_{slow2}, c^{-1}	ΔA_{max}^{slow2}	α_1	α_2	α_3
1*	6,96	92,58	0,0138	4,5	0,585	26,36	0,5	1,48	0,5
2*	6,96	126,99	0,0138	2,63	0,585	23,76	0,4	0,18	0,61

1* – параметри системи визначалися за формулою (17) з урахуванням розподілу інтенсивності збуджуючого світла вздовж його оптичного шляху;

2* – параметри системи визначалися за формулою (5), яка не враховує розподілу інтенсивності збуджуючого світла вздовж кювети.

Згідно з оцінкою за формулою (9) слід брати кювету шириною до 5 мм, щоб світло, що проходить крізь зразок із двох сторін, розподілялося рівномірно вздовж оптичного шляху.

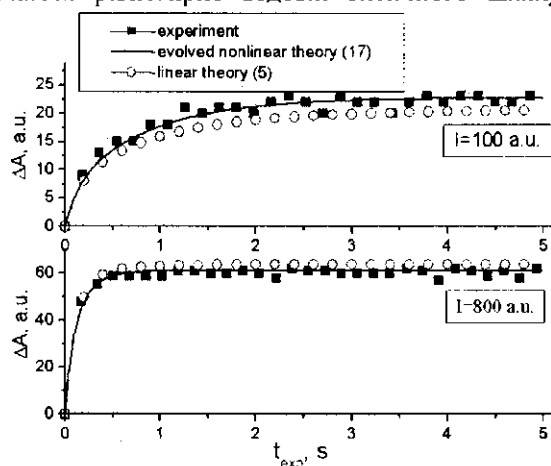


Рис. 10. Динаміка зміни оптичного поглинання реакційними центрами пурпурових бактерій при фотозбудженні

За розрахунками по ітераційній процедурі рівномірний розподіл світла, що проходить крізь РЦ, слід урахувувати при використанні кювет товщиною понад 4 мм. Таку кількісну оцінку ми провели, зробивши розрахунки для розподілу інтенсивності світла по кюветі для системи, що описується параметрами, наведеними у таблиці.

Як видно з рисунків, необхідність урахування ефектів, пов'язаних з нелінійним значенням коефіцієнта поглинання, є правомірною. Відзначимо і той факт, що для жовтого протеїну (у теоретичних розрахунках кінетичних параметрів системи з урахуванням зміни коефіцієнта поглинання зразка вздовж кювети) спостерігаємо більші відхилення від експериментальних даних, ніж у експериментах з реакційними центрами. Це пояснюється розмірами кювет, в яких досліджувалися зразки.

Автори вдячні Фонду фундаментальних досліджень України за підтримку.

1. Рубин А. Б. Биофизика. – Т. 2. – М., 2000. – 468 с.
2. Warren Zippel and Thomas G. Owens. Calculation of absolute photosystem I absorption cross-sections from P700 photo-oxidation kinetics. – Photosynthesis Reserch. – V. 29. – 1991. – P. 23–35.
3. Baltscheffsky M., ed. Current research in photosynthesis. – Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. – V. 1, 2. – 1990.
4. Okamura M. Y. and Feher G. Proton transfer in reaction centers from photosynthetic bacteria. – Annu. Rev. Biochem. – V. 61. – 1992. – P. 861–896.
5. Hoff W. D., van Stokkum I. H. M., van Ramesdonk H. J. et al. Measurement and global analysis of the absorbance changes in the photocycle of the photoactive yellow protein from *Ectothiorhodospira halophila*. – Biophys. J. – V. 67. – 1994. – P. 1691–1705.
6. Genick U. K., Borgstahl G. E. O., Ng K., Ren Z., Pradervand C., Burke P. M., Srajer V., Teng T. Y., Schildkamp W., McRee D. E., Moffat K. and Getzoff E. D. Millisecond Time-Resolved Laue Crystallography: Structure of a Protein Photocycle Intermediate. – Science. – V. 275. – 1997. – P. 1471–1475.
7. Stowell M. H. B., McPhillips T. M., Rees D. C., Soltis S. M., Abresch E. & Feher G. Light-induced structural changes in photosynthetic reaction center: implications for mechanism of electron-proton transfer. – Science. – V. 276. – 1997. – P. 812–816.
8. Borgstahl G. E. O., Williams D. R. and Getzoff E. D. The 1.4 Å Structure of Photoactive Yellow Protein, a Cytosolic Photoreceptor: Unusual Fold, Active Site and Chromophore. – Biochemistry. – V. 34. – 1995. – P. 6278–6287.
9. Dux P., Rubinstenn G., Vuister G. W. et al. Solution Structure and Backbone Dynamics of the Photoactive Yellow Protein. – Biochemistry. – V. 37. – 1998. – P. 12689–12699.
10. Goushcha A. O., Scott G. W., Kharkyanen V. N. and Holwarth A. R. Self-Regulation Effects in Bacterial Reaction Centers. 1. General Theory. – Biophys. J. – V. 79. – № 3. – 2000. – P. 1237–1252.
11. Goushcha A. O., Manzo A. J., Scott G. W., Christophorov L. N., Knox P. P., Barabash Y. M., Kapoustina M. T., Berezetska N. M. and Kharkyanen V. N. Self-Regulation Phenomena Applied to Bacterial Reaction Centers: 2. Nonequilibrium Adiabatic Potential: Dark and Light Conformations Revisited. – Biophys. J. – V. 84. – № 2. – 2003. – P. 1146–1160.
12. Himmelbau D. M. Process analysis by statistical methods. – John Wiley & Sons, Inc. – 1970.
13. Himmelbau D. M. Basic Principles and Calculations in Chemical Engineering. – 1972.

M. Olenchuk

STUDY OF PHOTOEXCITATION AND RELAXATION KINETICS OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES IN SPATIALLY DISTRIBUTED SYSTEMS

Process of photoinduction and relaxation of photoinduced states in biomacromolecules of elongated samples is theoretically studied. In this case we have the light passes through the sample with essential deviation from Bouguer-Beer-Lambert law. It was found the possible stationary distributions of intensity of the light through elongated sample, a new calculated method for study of kinetics of photoinduction and relaxation of elongated samples of biological molecules. The obtained theoretical results have been applied for study of processes charge transfer in bacterium reaction center and photoinduced rearrangement structure in yellow protein molecules. The first it was found parameters that characterizes a stationary and kinetic properties of the biological molecules under study.