

Статья

Влияние нового ингибитора фотосинтеза $[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$ комплекса на активность фотосистемы II в шпинате

Сергей К. Жармухамедов ^{1,*}, Мехрибан С. Шабанова ², Маргарита В. Родионова ³, Ирада М. Гусейнова ², Мехмет Сайым Карабан ⁴, Нуркан Карабан ⁴, Кюбра Бегюм Асюк ⁴, Владимир Д. Креславский ¹, Салех Алвасель ⁵ и Сулейман И. Аллахвердиев ^{1,2,3,6,*}



¹ Институт фундаментальных биологических проблем, ФНЦ ПНЦБР РАН, 142290 Пущино, Россия

² Лаборатория бионанотехнологий, Институт молекулярной биологии и биотехнологии, Национальная академия наук Азербайджана, AZ1073 Баку, Азербайджан

³ К.А. Тимирязева Институт физиологии растений, Российской академия наук, Ботаническая улица, 35, 127276 Москва, Россия

⁴ Кафедра химии, факультет естественных наук, Университет Гази, Текникокуллар, Анкара 06500, Турция

⁵ Научный колледж, Университет короля Сауда, Эр-Рияд 12372, Саудовская Аравия

⁶ Кафедра физиологии растений, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы 1-12, 119991 Москва, Россия

* Переписка: watcher01@rambler.ru (S.K.Z.); suleyman.allakhverdiev@gmail.com (S.I.A.)

условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Цитирование: Жармухамедов

С.К., Шабанова М.С., Родионова

М.В., Гусейнова И.М., Карабан М.С.,

Карабан Н., Асыйк К.Б.;

Креславский В.Д., Алвасель С.,

Аллахвердиев С.И. Влияние

нового ингибитора фотосинтеза

$[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$ комплекса на

активность фотосистемы II в

шпинате. *Cells* **2022**, *11*, 2680.

<https://doi.org/10.3390/cells11172680>

Научный редактор: Сэйдэи
Акимото

Получено: 4 августа 2022 г.

Принято: 25 августа 2022 г.

Опубликовано: 28 августа 2022 г.

Примечание издателя: MDPI
сохраняет нейтралитет в
отношении юрисдикционных
претензий в опубликованных
картах и институциональных
аффилиациях.



Copyright: © 2022 by the authors.

Лицензиат MDPI, Базель,

Швейцария. Данная статья

является статьей с открытым

доступом и распространяется на

Аннотация: Было изучено влияние нового комплекса $[CuL_2]Br_2$ ($L = \text{бис}\{4\text{H}-1,3,5\text{-триазино}[2,1-\text{b}]\text{бензотиазол-2-амин,4-(2-имидазол)}\}-\text{бромидный комплекс меди(II)}$) на активность фотосистемы II (PSII) мембран PSII, выделенных из шпината. Отсутствие фотосинтетического выделения кислорода мембранами PSII без искусственных акцепторов электронов, но в присутствии $[CuL_2]Br_2$, показало, что он не способен действовать как акцептор электронов PSII. В присутствии искусственных акцепторов электронов $[CuL_2]Br_2$ ингибитирует фотосинтетическую эволюцию кислорода. $[CuL_2]Br_2$ также подавляет фотоиндуцированные изменения выхода флуоресценции хлорофилла PSII (FV), связанные с

фоторедукцией первичного хинонового акцептора электронов, QA. Ингибиование обеих характерных реакций PSII зависит от концентрации $[CuL_2]Br_2$. При всех исследованных концентрациях $[CuL_2]Br_2$ снижение уровня Fm происходит исключительно за счет снижения Fv. $[CuL_2]Br_2$ не вызывает ни изменения уровня F0, ни замедления фотоиндуцированного подъема Fm, который характеризует эффективность доставки электронов от донорных компонентов к QA через реакционный центр (РЦ) PSII. Искусственные доноры электронов (аскорбат натрия, ДФК, Mn2+) не отменяют ингибирующего действия $[CuL_2]Br_2$. Зависимости эффективности ингибиования изученных реакций PSII от концентрации комплекса $[CuL_2]Br_2$ практически совпадают. Константа ингибиования Ki составляет около 16 мкМ, а logKi - 4,8. Поскольку $[CuL_2]Br_2$ не изменяет присущую ароматическим аминокислотам флуоресценцию компонентов белка PSII, можно предположить, что $[CuL_2]Br_2$ не оказывает существенного влияния на нативное состояние белков PSII. Результаты, полученные в настоящем исследовании, сравниваются с литературными данными относительно ингибирующего действия на PSII Cu(II) аква-ионов и Cu(II)-органических комплексов.

Ключевые слова: ингибиторы фотосинтеза; медь; металлоорганические комплексы; фотосистема II; эволюция кислорода; собственная флуоресценция ароматических аминокислот

1. Введение

Сорняки, особенно быстрорастущие и постоянно появляющиеся виды, устойчивые к гербицидам, являются одним из основных факторов, ограничивающих урожайность экономически важных культур. Передовые технологии повышения урожайности путем создания генетически модифицированных видов растений предполагают одновременное применение гербицидов для уничтожения сорняков. Устойчивость к этим гербицидам была создана у культурных растений путем генной манипуляции [1]. Однако даже при таких подходах необходим поиск более эффективных ингибиторов, которые должны действовать при максимально низких концентрациях и быть способными избирательно подавлять

реакции фотосинтеза, характерные только для растительных клеток, и поэтому, возможно, они могут быть более безопасными для человека и фауны [2].

Фотосинтез обеспечивает рост и развитие растений за счет энергии Солнца, что является уникальной характеристикой растительных клеток. Фотосистема II (PSII), один из основных комплексов фотосинтетического аппарата (ФА), расщепляет воду на электроны, протоны и кислород [3]. Среди всех комплексов ПА, PSII и его кислородно-эволюционный комплекс (ОЕС) являются местом повреждения в результате многих стрессов и агентов [4], включая образование реактивных видов кислорода [5]. Чтобы уничтожить сорняки без вреда для млекопитающих, можно подавить активность любого компонента ПА. Однако эффективнее подавлять наиболее уязвимую часть ПА, а именно PSII ОЕС. Именно так действуют большинство гербицидов, ингибиторы фотосинтеза, такие как производные мочевины, триазина, а также фенольные ингибиторы [6].

Наряду с упомянутыми ингибиторами фотосинтетической электрон-транспортной цепи, и главным образом PSII, было предпринято несколько попыток разработать новые ингибирующие органические комплексы [7-10], комплексы органических лигандов с полуметаллами (Sb, As и др.) [11] и переходными металлами (Fe, Pb, Co, Ni, Cr, Zn) [12-14], включая металлоорганические комплексы на основе меди (Cu(II)) [15,16].

Большинство используемых полуметаллов и металлов (включая катионы меди) практически не встречаются в свободном виде в окружающей среде из-за их высокой способности вступать в разнообразные химические реакции, а также низкой растворимости в гидрофобных средах. Катионы меди (Cu^{2+}) легко взаимодействуют с различными органическими лигандами, включая этилендиаминетрауксусную кислоту [17-19], и компонентами как органических (TRICINE, ADA, PIPES, ACES, Cholamine chloride, BES, Tris, TES, HEPES, MES, Acetamidoglycine, BICINE, Glycyl-glycine), так и неорганических фосфатных буферных растворов [20], а также с различными окислительно-восстановительными агентами - экзогенными донорами и акцепторами электронов, такими как аскорбиновая кислота [21], гидроксиламин [22], дитионит [23], дифенилкарбазид (ДФК) [24,25], NADH [26], различные хиноны [27] и ферроцианид [28], широко применяемые в экспериментах по фотосинтезу. Поэтому в почвах, в водных растворах и в различных биологических системах медь в основном присутствует в виде хелатных металлоорганических комплексов [29].

Комплексообразование металла с органическим(и) лигандом(ами) может значительно расширить возможности использования иона металла в качестве ингибитора биологической активности, поскольку позволяет настроить доступность металла к конкретному месту действия путем изменения ряда свойств такого комплексного агента за счет подбора оптимального лиганда(ов), как это показано, например, для комплексов синтетических катализаторов окисления воды [30,31]. Комплексообразование металла с лигандом(ами) наделяет комплекс новыми специфическими свойствами, облегчая создание и поддержание необходимой архитектуры в различных условиях, повышая селективность и возможность легкой координации с мишенью, тем самым повышая общую эффективность ингибирования [32]. В комплексе не только металл, но и лиганд(ы) может быть биологически активным, что повышает общую активность металлоорганического комплекса. Лиганд(ы) может быть биологически неактивным, но стабилизировать или защищать реакционноспособный металл от беспорядочного взаимодействия с нежелательными мишениями. В комплексе на основе металла, который не координируется непосредственно с мишенью, лиганд(ы) может обеспечить связывание комплекса с сайтом связывания [32]. Тем не менее, в биологических эффектах металлоорганических комплексов главную роль по-прежнему играет металл. Это относится и к металлоорганическим комплексам на основе меди.

Были показаны различные участки и влияние водных ионов Cu^{2+} на различные PSII компо-

ентов. Исследуя ингибирующее действие аква-ионов меди на PSII, разные исследователи обнаружили многочисленные, часто противоречивые эффекты на

донорной и акцепторной сторонах, а также на компонентах реакционного центра PSII. Ионы меди Cu(II) замещают магний в хлорофиллах и бактериохлорофиллах [33]. Сайт связывания Cu находится вблизи ОЕС [34]. Ингибиование реакции DPIP-Хилла через PSII с помощью Cu²⁺ было восстановлено Mn(II), но только в фосфатном (не в Hepes) буфере [35]. Подавляя вторичный перенос электронов на донорной и акцепторной сторонах PSII путем инкубации с линоленовой кислотой, было показано, что сор-рег (CuCl₂) ингибирует первичное разделение зарядов в РЦ PSII, предположительно путем создания

повреждений вблизи РЦ и усиливая рассеивание поступающей энергии возбуждения в тепло [36]. Тот факт, что 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина (DCMU) не изменяет характер ингибирования Cu²⁺ индукции флуоресценции хлоропластов при комнатной температуре, предполагает, что Cu²⁺ и DCMU не конкурируют друг с другом, и, следовательно, имеют разные ингибиторные сайты внутри PSII [36]. Однако противоположные результаты [37] показали, что интенсивность флуоресценции при комнатной температуре снижалась при добавлении сульфата меди и частично восстанавливалась при добавлении DCMU, что свидетельствует о том, что Cu²⁺ и DCMU конкурируют друг с другом, и, следовательно, ингибирующий сайт Cu²⁺ в PSII совпадает с сайтом DCMU, по крайней мере частично. Cu(II) имеет специфический ингибирующий сайт связывания, взаимодействуя с необходимой аминокислотной группой (группами), которая может быть протонирована или депротонирована в ингибирующем сайте связывания, и механизм ингибирования Cu(II) является неконкурентным по отношению к 2,6-дихлор-1,4-бензохинону (DCBQ) и DCMU и конкурентным по отношению к H⁺ [38]. Cu влияет на транспорт электронов PSII на акцепторной стороне домена Pheo-Fe-Q_A [39,40]. CuCl₂ значительно снижает сродство связывания атразина с PSII (K_D), но не изменяет количество сайтов связывания по сравнению с контролем [41]. Кроме того, 100 мкМ CuSO₄ не влияет на разделение зарядов и образование (P₆₈₀^{+Q_A⁻), но изменяет свойства TugZ и/или его непосредственного микроокружения, блокируя перенос электронов на P₆₈₀⁺ [42]. Cu²⁺ (CuSO₄) ингибирует окисление TugZ с помощью P₆₈₀⁺, быстро устранив индуцированный светом сигнал ЭПР II, и этот эффект не может быть отменен ЭДТА [43]. На мембранных PSII, при использовании пикосекундной времязадержки флуоресценции, было показано, что Cu(II) не влияет на образование первичной радикальной пары, но сильно влияет на образование расслабленной радикальной пары путем нейтрализации отрицательного заряда на Q_A⁻ и устранения отталкивающего взаимодействия между Pheo- и Q_A⁻ и/или путем изменения общих диэлектрических свойств белковой области, окружающей эти кофакторы. Кроме того, предполагается тесное притягивающее взаимодействие между Pheo-, Q_A⁻ и Cu²⁺ [44]. В мембране PSII Cu усиливает фотоингибирование [45], катализируя производство гидроксильных радикалов [45]. Ca²⁺ конкурентно предотвращает ингибирование Cu²⁺ активности выделения O₂ в мембранных PSII, омыемых NaCl [46]. В составе комплекса на основе Cu, Cu замещает эндогенные ионы Ca²⁺ и Mn²⁺ из ОЕС [15]. Ионы Cu из соединений, изученных в [15], и другие комплексы на основе водной Cu [47] воздействуют как на TugZ белка D1, так и на TugD белка D2 реакционного центра PSII. CuCl₂ окисляет обе формы (LP и HP) цитохрома b₅₅₉, при низких (1-10 мкМ) и более высоких (10-100 мкМ) концентрациях, соответственно, а также хлорофилл Z, и эти участки являются источником меди-индуцированного тушения флуоресценции и ингибирования выделения кислорода в PSII [48]. Исчерпывающие обзоры различных сайтов и эффектов водных ионов Cu²⁺ на различные компоненты PSII подробно описаны в нескольких публикациях [49,50]. Целью данной работы было изучение возможного влияния нового металлоорганического комплекса Cu(II) (бис{4Н-1,3,5-триазино[2,1-*b*]бензотиазол-2-амин,4-(2-имиазол)}-бромидный комплекс меди(II) (CuL₂]Br₂) на фотосистему II. Для анализа влияния этого комплекса на активность мембранных PSII, выделенных из шпината, мы исследовали фотосинтетическую эволюцию кислорода мембранными PSII; фотоиндуцированные изменения выхода флуоресценции хлорофилла PSII (Fv), связанные с фоторедукцией первичного хинонового акцептора электронов, Q_A; а также внутреннюю флуоресценцию ароматических аминокислот (компонентов белков PSII); при различных концентрациях [CuL₂]Br₂. Результаты, полученные в настоящем исследовании, сравниваются с литературными данными по ингибирующему действию на PSII Cu(II) аква-ионов и Cu(II)-органических комплексов.}

2. Материалы и методы

2.1. Изоляция тилакоидов

Тилакоиды были выделены из листьев тепличного шпината (*Spinacia oleracea* L.) по методу, аналогичному описанному ранее [51], и суспендированы в среде (A), содержащей 20 mM Mes-NaOH (pH 6,5), 0,33 M сахарозы, 15 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, и 10% глицерина, и хранились при -80 ° C.

2.2. Изоляция мембран PSII

Обогащенные кислородом фрагменты тилакоидных мембран PSII (мембранны PSII) были выделены из листьев тепличного шпината (*Spinacia oleracea L.*), как описано ранее [52], с небольшой модификацией, как в [53]. Использовалось аналогичное мемbrane PSII соотношение молекул RC (де-терминированных из фоторедукции феофитина) к молекулам хлорофилла около 1/200-220 [54]. Мембранны были способны выделять фотосинтетический кислород со скоростью 400-500 мкмоль O₂ (мг Хл)⁻¹ ч⁻¹ при насыщающем свете в присутствии 0,1 мМ 2,5-дихлор-п-бензохинона и 1 мМ K₃Fe(CN)₆ в качестве акцепторов электронов. Мембранны PSII были супензированы в среде (A) и быстро заморожены для хранения при -80 °C. Концентрацию общего хлорофилла в мембранных PSII определяли в 96% (v/v) этаноле, как описано ранее [55].

2.3. Измерения фотосинтетической эволюции кислорода

Скорость стационарной светоиндуцированной эволюции кислорода с помощью мембранны PSII измеряли полярографически в среде A при непрерывном насыщенном красном свете ($\lambda > 650$ нм, 1200 мкмоль фотон с⁻¹ м⁻²) при 25 °C с помощью кислородного электрода Кларка типа Hansatech (Hansatech Instruments Ltd., Норфолк, Великобритания), подключенного к термостату с контролем температуры воды, в присутствии комбинации двух искусственных акцепторов электронов: 100 мкМ сильно лиофильного дихлор-п-бензохинона (DCBQ), растворенного в диметилсульфоксида (DMSO), и 1 мМ феррицианида калия (FeCN) в качестве дополнительных акцепторов электронов для поддержания DCBQ в окисленном состоянии [56]. Концентрация мембранны PSII была эквивалентна 20 мкг мл⁻¹ хлорофилла. Скорость оценивали по наклону кинетики в течение первых 30 с после включения актиничного света. Ранее [57], согласно данным о зависимости скорости фотоиндуцированного выделения кислорода частицами PSII от концентрации DCBQ, было показано, что самые высокие выходы кислорода регистрировались в присутствии 25-200 мкМ DCBQ.

2.4. Измерения фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции хлорофилла PSII

Фотохимическую активность PSII также анализировали путем измерения кинетики светоиндуцированных изменений выхода флуоресценции хлорофилла PSII (ΔF), связанных с фоторедукцией первичного акцептора электронов PSII, пластохинона Q_A, с помощью флуорометра с импульсно-амплитудной модуляцией (PAM) (XE-PAM, Heinz Walz, Германия) и сопутствующего программного обеспечения Power Graph Professional 3.3 в среде A в 10-миллиметровой кювете при комнатной температуре. Определяли характерные значения F_v, F₀, F_m, максимальный квантовый фотохимический выход PSII (отношение F_v/F_m), а также отношение F_v/F₀. Здесь F₀ - уровень флуоресценции до подачи актиничного света, измеренный при слабом освещении измерительным светом, а F_m - максимальный уровень флуоресценции, F_v = F_m - F₀. Для регистрации уровня флуоресценции F₀ предварительно адаптированный к темноте образец освещали слабыми зондирующими импульсами измерительного света ($\lambda = 490$ нм; 4 мкмоль м⁻² с⁻¹; ксеноновая измерительная лампа-вспышка, 64 Гц, BG39, Schott). Для регистрации фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции хлорофилла PSII (F_v), адаптированные к темноте образцы освещали светом насыщающей интенсивности ($\lambda = 490$ нм; 1000 мкмоль м⁻² с⁻¹, BG39, Schott).

2.5. Взаимодействие между PSII и PSI через измерения цепи переноса электронов

Влияние комплекса [CuL₂]Br₂ на взаимодействие PSII и PSI через электронтранспортную цепь изучали на тилакоидах по характерному снижению выхода флуоресценции хлорофилла PSII за счет окисления Q_A⁻ при дополнительном возбуждении PSII так называемым Светом 1, который преимущественно возбуждает PSII, как в [58]. Свет 1 был получен путем комбинирования двух светофильтров, Szs20 и KS19. Спектр пропускания при

совмещении светофильтров (Свет 1) показан на соответствующем рисунке ниже в параграфе 3.7. Последовательность действий была следующей. После достижения уровня F_m (Q_A полностью снижался) в результате освещения тилакоидов, при этом Свет 2 преимущественно возбуждал PSII, Свет 2 выключался, а во время темнового спада F_m (темнового окисления Q_A^-) включался Свет 1. В этом случае, когда

взаимодействие между PSII и PSI (контроль) не ингибирировано, наблюдалось ускорение темнового распада F_m (окисление Q_A⁺) из-за дополнительного преобладающего возбуждения PSI светом 1.

2.6. Измерения флуоресценции ароматических аминокислот

Возможные изменения в состоянии, структуре и окружении белка (белков) (включая белки PSII) в результате связывания ингибирующим агентом могут быть обнаружены по изменению собственной флуоресценции (главным образом, по изменению интенсивности флуоресценции) аминокислот с боковыми цепями ароматического кольца (триптофан (Trp), тирозин (Tyr) и фенилаланин (Phe)), преимущественно Trp и Tyr [8,9,59]. Вероятное взаимодействие [CuL₂]Br₂ с мембранными белками PSII исследовали путем наблюдения за изменением собственной флуоресценции ароматических аминокислот этих белков по методике, описанной ранее в [8,9,59]. Спектры эмиссии флуоресценции ароматических аминокислот, суспендированных в мембранах PSII, регистрировали на флуоресцентном спектрофотометре Agilent Cary Eclipse (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Образцы суспензии мембран PSII с исследуемым комплексом [CuL₂]Br₂ и без него возбуждали при длине волны 275 нм с шириной спектральной щели возбуждения 20 нм, а эмиссию флуоресценции регистрировали в диапазоне от 290 нм до 420 нм с шириной спектральной щели эмиссии 10 нм. Перед измерениями образцы инкубировали в присутствии исследуемого комплекса в темноте в течение 3 мин (или 21 мин). Комплекс добавляли к суспензии мембран PSII в растворе ДМСО. Концентрация ДМСО во всех образцах была такой же, как в контроле (не более 5%). Концентрация PSII-мембранны была эквивалентна 10 мкг мл⁻¹ хлорофилла.

3. Результаты

3.1. Синтез лиганда и комплекса меди(II) [CuL₂]Br₂

3.1.1. Синтез лиганда

Лиганд 4Н-1,3,5-триазино [2,1-*b*]бензотиазол-2-амин,4-(2-имидацол) был впервые синтезирован реакцией конденсации между альдегидами (2-тиофенкарбальдегид/ 2-имидацолкарбальдегид) и 2-гуанидобензимидазолом или 2-бензотиазолегуанидином. Раствор 2-бензотиазолегуанидина (0,192 г) в метаноле (25 мл) обрабатывали 2-имидацолкарбоксилальдегидом (0,096 г) и двумя каплями пиперидина. Смесь перемешивали при 60 °C в течение 5 дней. Полученное оранжевое твердое вещество было отделено фильтрацией, промыто метанолом и высушено под вакуумом. Рассчитано для C₁₂H₁₀N₆S (мол. масса 270,31): C, 53.32; H, 3.73; N, 31.09; S, 11.86. Найдено: C, 53.39; H, 3.79; N, 31.11; S, 11.89. ИК-спектр (KBr, ν/см⁻¹): 3412, 3296, 1639, 1509, 1249. ЖХ-МС: *m/z* = 270,31 (M⁺). ¹H-ЯМР(400 МГц, ДМСО-d₆) δ: 6,65 (1H, s)

3.1.2. Электрохимический синтез комплекса меди(II) [CuL₂]Br₂

Новые комплексы меди(II) [CuL₂]Br₂ были синтезированы электрохимическим методом [60] с использованием платиновой проволоки в качестве катода (1 см × 1 см) и медной пластины в качестве жертвенного анода. Так, метанольный раствор (30 мл) лиганда (~1 ммоль), содержащий около 15 мг бромида тетрабутиламмония в качестве поддерживающего электролита, в стакане (100 мл) подвергался электролизу при комнатной температуре в течение 3 ч. Приложенное напряжение 5 В обеспечивало протекание тока, достаточного для плавного растворения меди. Полученное твердое вещество было выделено, промыто водой и высушено под вакуумом. Структура исследуемого лиганда (4Н-1,3,5-триазино [2,1-*b*]бензотиазол-2-амин,4-(2-имидацол)) и Cu(II)-комплекса (Bis{4Н-1,3,5-триазино [2,1-*b*]бензотиазол-2-амин,4-(2-имидацол)}бромид меди(II)) показана на рисунке 1A, B - расширенные структурные формулы; C - оптимизированные молекулярные структуры. C₂₄H₂₂Br₂CuN₁₀: ИК (KBr, ν/см⁻¹): 3402, 3251, 1600, 1552, 1263. ЖХ-МС: *m/z* = 566,58 (M+2).

Элементный анализ: C:39,49; H:3,04; Br:21,90; Cu:8,71; N:26,87.

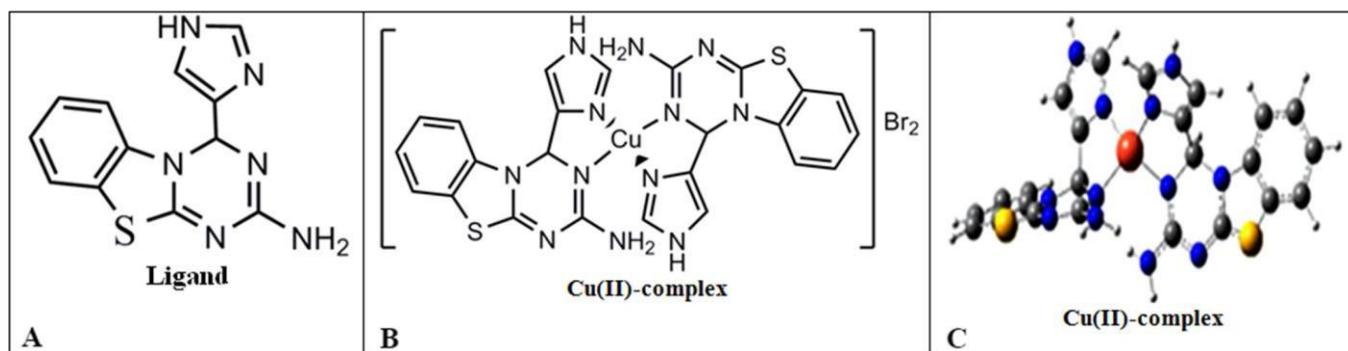


Рисунок 1. Испытываемый лиганд ($4\text{H}-1,3,5$ -триазино [$2,1\text{-b}$]бензотиазол-2-амин,4-(2-имидазол)) (A) и $\text{Cu}(\text{II})$ -комплекс ($\text{Bis}\{4\text{H}-1,3,5$ -триазино [$2,1\text{-b}$]бензотиазол-2-амин,4-(2-имидазол)\}\text{медь(II)} бро-мид) (B,C). (A,B), расширенные структурные формулы. (C), оптимизированные молекулярные структуры.

3.2. Влияние $[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$ на фотосинтетическую эволюцию кислорода

Поскольку аква-ионы $\text{Cu}(\text{II})$ (1) могут окислять многие неорганические и органические соединения (показано вверху) (2), стимулировать фотосинтетическую эволюцию кислорода при низких концентрациях [61,62], и (3) возможные аква-ионы $\text{Cu}(\text{II})$ сохранили эти способности в составе $[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$, мы протестировали $[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$ в качестве искусственного акцептора электронов для PSII в реакции фотосинтетической эволюции кислорода. Однако в присутствии только $[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$ (от 1 мкМ до 30 мкМ) в отсутствие других искусственных акцепторов электронов (AEA) не наблюдалось выделения кислорода мембранами PSII, как показано на рисунке 2 (кинетика 6).

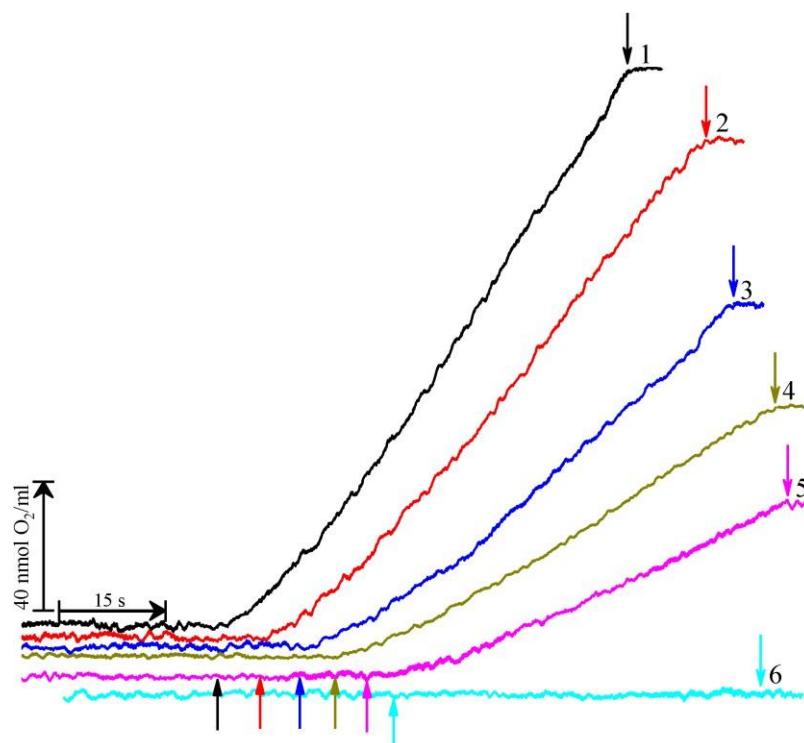


Рисунок 2. Кинетика выделения кислорода мембранами PSII в отсутствие каких-либо добавок (1) и в присутствии $[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$ при концентрации 3 мкМ (2); 20 мкМ (3); 50 мкМ (4); 100 мкМ (5). Среда анализа содержала 50 мМ MES (рН 6,5), 0,33 М сахарозы, 15 мМ NaCl, 0,1 мМ DCBQ, 1 мМ FeCy. ↑ и ↓ - с в е т ($\lambda = 650$ нм, 1200 мкмоль фотон с⁻¹ м⁻²) включен и свет выключен, соответственно. Кинетика 6 измерялась в отсутствие искусственных акцепторов электронов, но в присутствии 30 мкМ $[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$. Тот факт, что PSII-мембранны не выделяют кислород при таких условиях, свидетельствует о том, что $[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$ не может служить искусственным акцептором электронов. Концентрация PSII-мембран была эквивалентна 20 мкг мл⁻¹.

В присутствии AEA (DCBQ плюс FeCy) без $[CuL_2]Br_2$ (контроль) мембранны PSII генерируют кислород при непрерывном освещении насыщающим светом со скоростью около 480 мкмоль O_2 (мг Хл ч⁻¹ (рис. 2, кинетика 1). Эта активность сопоставима с той, которая была описана ранее для аналогичных мембран PSII [63,64]. $[CuL_2]Br_2$ ингибирует выделение кислорода в зависимости от концентрации. При концентрациях 3 мкМ (2), 20 мкМ (3), 50 мкМ (4) и 100 мкМ скорость реакции снижается примерно на 15%, 43%, 59% и 69% по сравнению с контролем (100%) (рис. 2, кинетика 2-5). Реакция практически полностью подавляется 10 мМ $[CuL_2]Br_2$ (не показано). Степень ингибирования мембраны PSII не зависит от продолжительности инкубации (5-20 мин) в присутствии $[CuL_2]Br_2$.

3.3. Влияние $[CuL_2]Br_2$ на фотоиндуцированные изменения выхода флуоресценции хлорофилла PSII

Подавление фотосинтетического выделения кислорода является одним из наиболее значимых признаков того, что данный агент действительно

является ингибитором функциональной активности PSII. Однако, результаты, полученные в нашем исследовании, не позволяют судить о том, (1) является ли этот агент

действует на стороне донора или акцептора или на уровне РЦ, или (2) на какой промежуточный звено электронтранспортной цепи PSII влияет этот агент, и (3) действует ли этот агент как ингибитор переноса электронов или как экзогенный донор (акцептор) электронов, способный эффективно конкурировать с нативными эндогенными компонентами и тем самым нарушать нормальный ход фотохимических реакций PSII. Информация (а) о локализации сайта ингибирования данного ингибитора в PSII, (б) о количестве сайтов действия и расположении основного и/или дополнительного сайта (сайтов) ингибирования, (с) о возможном механизме действия ингибитора можно получить, используя фотоиндуцированные изменения выхода флуоресценции хлорофилла PSII (F_v), связанные с фотовосстановлением первичного хинонового акцептора электронов Q_A , в том числе с использованием экзогенных доноров (акцепторов) электронов и/или известных ингибиторов с хорошо изученным действием на PSII. Поэтому мы решили использовать этот метод для получения более подробной информации о сайте (сайтах) и механизме ингибирующего действия $[CuL_2]Br_2$ на PSII.

Результаты этих исследований представлены на рисунке 3.

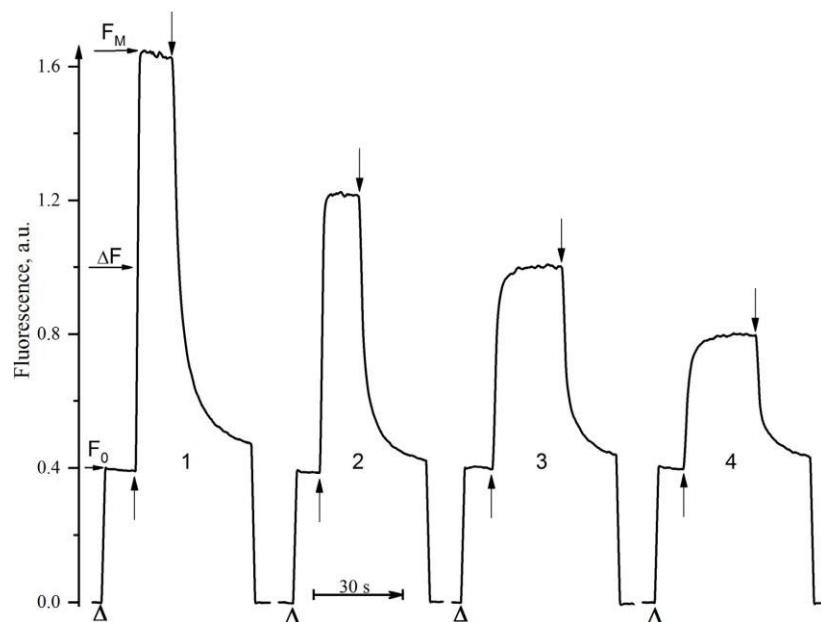


Рисунок 3. Кинетика фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции хлорофилла PSII (ΔF), связанных с фотовосстановлением первичного хинонового акцептора электронов Q_A в мембранах PSII в отсутствие каких-либо добавок (кинетика 1) и в присутствии $[CuL_2]Br_2$ при концентрации 8 мкМ (кинетика 2), 30 мкМ (кинетика 3) и 100 мкМ (кинетика 4). Символ треугольника обозначает момент включения измерительного света ($\lambda = 490$ нм, 4

мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹), возбуждающего флуоресценцию хлорофилла PSII, F₀ ($\lambda \geq 650$ нм). Стрелки вверх \uparrow и вниз \downarrow указывают на момент соответствующего включения и выключения актиничного света ($\lambda > 600$ нм, 1000 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹). Концентрация мембран PSII была эквивалентна 20 мкг мл⁻¹ хлорофилла.

На рисунке 3 показана кинетика фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции хлорофилла PSII (F_v), связанных с фоторедукцией первичного хинонового акцептора электронов, Q_A , в субхлоропластных мембранных частицах PSII в отсутствие каких-либо добавок (кинетика 1) и в присутствии $[CuL_2]Br_2$ в концентрациях 8 мкМ (кинетика 2), 30 мкМ (кинетика 3) и 100 мкМ (кинетика 4). В этих экспериментах мы определяли значения F_0 и F_m как максимальный и минимальный выход флуоресценции хлорофилла "а" в адаптированных к темноте образцах. Соответственно, F_v , рассчитанный как $F_m - F_0$, отношение F_v/F_m , фиксировал возможные изменения этих параметров, вызванные действием ингибитора, по сравнению с контролем. Кинетика контроля (измеренная в отсутствие эффектора) имела отношение F_v/F_m , равное $0,79 \pm 0,02$. Это значение указывает на достаточно высокую фотохимическую активность PSII в использованных мембранах PSII. В присутствии $[CuL_2]Br_2$ происходит значительное снижение уровня F_m (кинетика 2), и это снижение уровня F_m больше при более высоких концентрациях добавленного $[CuL_2]Br_2$ (кинетики 3 и 4). Здесь очень важно отметить, что при всех исследованных концентрациях $[CuL_2]Br_2$ снижение уровня F_m происходит исключительно за счет снижения F_v ; $[CuL_2]Br_2$ не вызывает никаких изменений в уровне F_0 (ни увеличения, ни уменьшения) (кинетики 2-4). Поэтому для оценки ингибирующей эффективности $[CuL_2]Br_2$ мы выбрали F_v в процентах по отношению к контролю. Ингибирование фотоиндуцированной F_v PSII составляет 66%, 48% и 32% при концентрациях $[CuL_2]Br_2$ 8 мкМ (кинетика 2), 30 мкМ (кинетика 3) и 100 мкМ (кинетика 4), соответственно. Эти данные хорошо согласуются с данными, полученными в экспериментах по фотосинтетической эволюции кислорода (рис. 2). Необходимо также отметить еще один важный экспериментальный факт: в присутствии всех исследованных концентраций $[CuL_2]Br_2$ наблюдается (а) как замедление, так и ускорение темновой релаксации F_m , отражающее, что происходит темновое переокисление восстановленного Q_A ; (б) замедления фотоиндуцированного повышения F_m также не происходит. Экзогенные доноры электронов (аскорбат натрия, ДПК, Mn^{2+}) не устраняют ингибирующий эффект $[CuL_2]Br_2$ на F_v , независимо от последовательности добавления этих реагентов (не показано). Более того, степень подавления F_v той же концентрацией $[CuL_2]Br_2$ не увеличивается с увеличением времени инкубации (3 и 21 мин) в присутствии этого ингибитора в темноте (не показано).

3.4. Зависимость ингибирования фотохимической активности мембран PSII от концентрации $[CuL_2]Br_2$

На рисунке 4 показана зависимость фотохимической активности мембран PSII от концентрации $[CuL_2]Br_2$, измеренная как фотосинтетическая эволюция кислорода (черные квадраты), так и светоиндуцированное изменение выхода флуоресценции хлорофилла PSII (красные круги). Обе представленные зависимости были измерены при концентрации мембран PSII, эквивалентной 20 мкг мл⁻¹ хлорофилла. Зависимость ингибирования выделения кислорода практически полностью совпадает с зависимостью подавления фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции хлорофилла PSII во всем диапазоне концентраций исследуемого агента. Обычно для количественной оценки потенции ингибитора используют специальный показатель. Это IC_{50} (или pIC_{50} - значение IC_{50} , переведенное в отрицательный десятичный логарифм $IC_{50} (-log IC_{50})$ для унификации) - концентрация агента, необходимая для ингибирования исследуемой активности до половины от исходного значения (контроль) [65,66]. IC_{50} является операционным параметром для оценки эффективной силы конкретного ингибирующего соединения, он сильно зависит от концентрации мембраны PSII и обычно выражается как концентрация хлорофилла [67,68]. В 1972 году Седено-Мальдонадо и др. [69] также показали, что ингибирование несвязанного транспорта электронов в хлоропластах ионами меди Cu^{2+} происходит на уровне PSII и зависит от соотношения ингибитор/хлорофилл. При высоких концентрациях хлорофилла для достижения той же степени ингибирования требуется больше ионов Cu^{2+} [69].

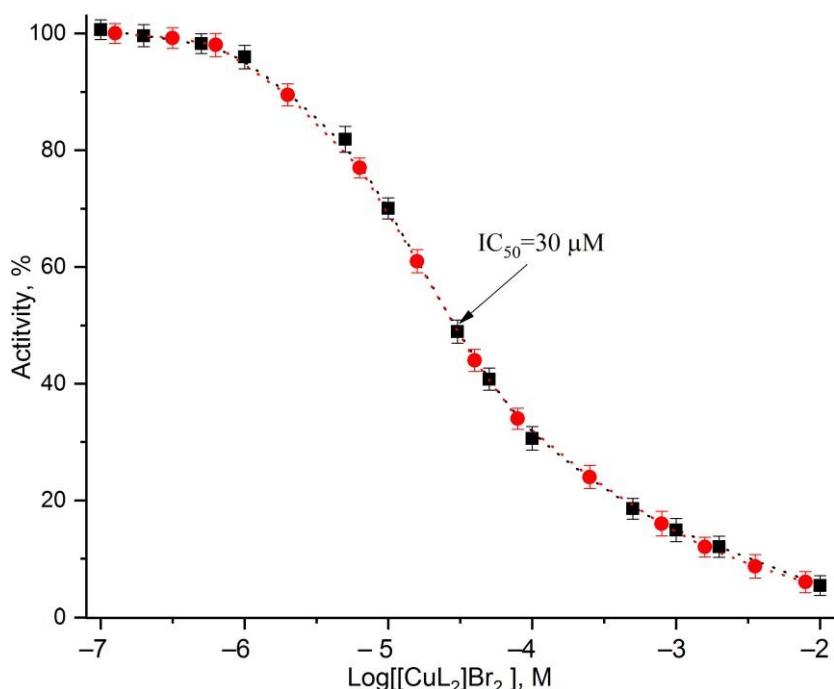


Рисунок 4. Зависимость ингибиования фотохимической активности мембран PSII от концентрации $[CuL_2]Br_2$, измеренной как по фотосинтетическому выделению кислорода (черные квадраты), так и по светоиндуцированным изменениям выхода флуоресценции хлорофилла PSII (красные кружки). Данные четырех независимых экспериментов представлены как среднее \pm SD. Концентрация мембран PSII была эквивалентна 20 мкг мл⁻¹ хлорофилла.

Как видно из данных, представленных на рисунке 4, для обоих измеренных характеристик фотохимических реакций PSII значения концентраций $[CuL_2]Br_2$, вызывающих подавление половины максимальных изученных активностей (IC_{50}), составляют около 30 мкМ. $[CuL_2]Br_2$ в концентрациях чуть более 0,1 мкМ вызывает лишь очень слабое подавление этих фотохимических активностей PSII. Почти полное (более 90% по сравнению с контролем) подавление обеих реакций наблюдалось при концентрации агента 10 мМ. Следует отметить, что все представленные данные были получены при концентрации мембранны PSII в 20 мкг мл⁻¹ хлорофилла.

3.5. Графическое определение значения K_i

Поскольку IC_{50} зависит от концентрации мембранны PSII, его нельзя использовать для сравнения результатов, полученных с помощью разных ингибиторов или для одних и тех же ингибиторов, полученных разными научными группами, без указания целевой концентрации, для которой было определено конкретное значение IC_{50} . В отличие от IC_{50} , другой параметр, K_i (константа ингибиования, характеризующая внутреннюю меру сродства связывания ингибитора с целевым сайтом), не зависит от концентрации мембранны PSII. Известен метод определения K_i на основе данных о значениях IC_{50} , полученных для различных концентраций мишени (в нашем случае мембранны PSII) [67]. Мы также применили этот метод (рис. 5). Мы определили значения IC_{50} для подавления светоиндуцированного выделения кислорода $[CuL_2]Br_2$ для девяти различных концентраций мембранны PSII. Затем мы построили график IC_{50} в зависимости от концентрации хлорофилла в виде линии и экстраполировали полученную линию к нулевой концентрации хлорофилла, как описано ранее [67]. Полученное значение IC_{50} , соответствующее нулевой концентрации хлорофилла, равно K_i (Рисунок 5). В нашем случае K_i составляет около 16 мкМ ($16,2 \pm 0,2$), а $-\log K_i = 4,8$. Исходя из объяснения и уравнения ($I_{50} = K_i + 1/2 xt$), приведенного в [67], можно оценить концентрацию $[CuL_2]Br_2$ - специфических сайтов связывания (xt) с концентрацией хлорофилла. В случае использованных нами концентраций мембранны PSII, например, равных 20 мкг мл⁻¹ или около 22 мкМ, мы определили, что $x t$ равно 1, т.е. одна молекула $[CuL_2]Br_2$ на одну молекулу хлорофилла.

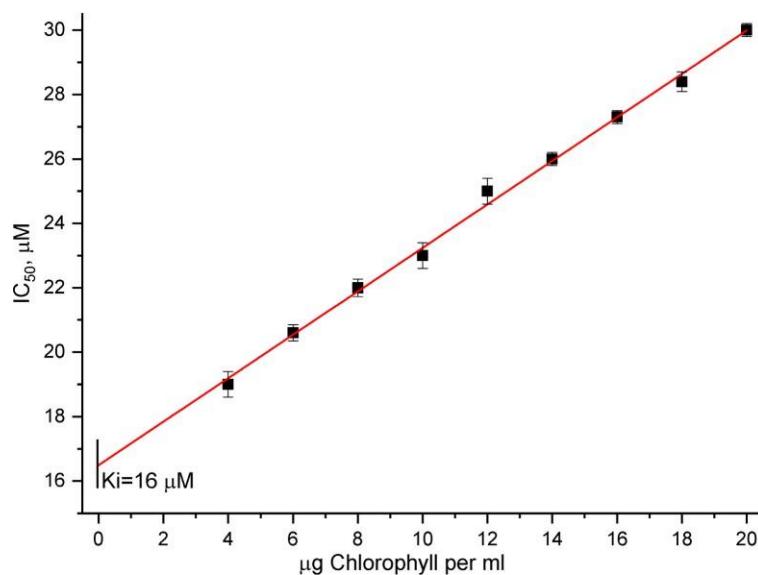


Рисунок 5. Изменения значений I₅₀ ингибиования выделения кислорода PSII различными концентрациями [CuL₂]Br₂ в зависимости от концентрации мембран PSII, использованных в экспериментах, выраженные в концентрации хлорофилла. Реакционная среда и условия измерений описаны в легенде к рисунку 1.

3.6. Графическая оценка количества мест связывания [CuL₂]Br₂

Известно [68], что если имеющиеся данные по ингибиованию представляют собой так называемый график Хилла (зависимость $\log(\text{inhibition}/(1-\text{inhibition}))$ от \log (концентрация ингибитора), то по наклону полученной линии можно оценить количество сайтов связывания на молекуле акцептора. Мы использовали этот метод для получения данных по ингибиованию светоиндуцированной эволюции кислорода PSII различными концентрациями [CuL₂]Br₂. На рисунке 6 показан такой график Хилла для этих данных. Как следует из рисунка 6, наклон полученной линии составляет около $1 (0,87 \pm 0,03)$.

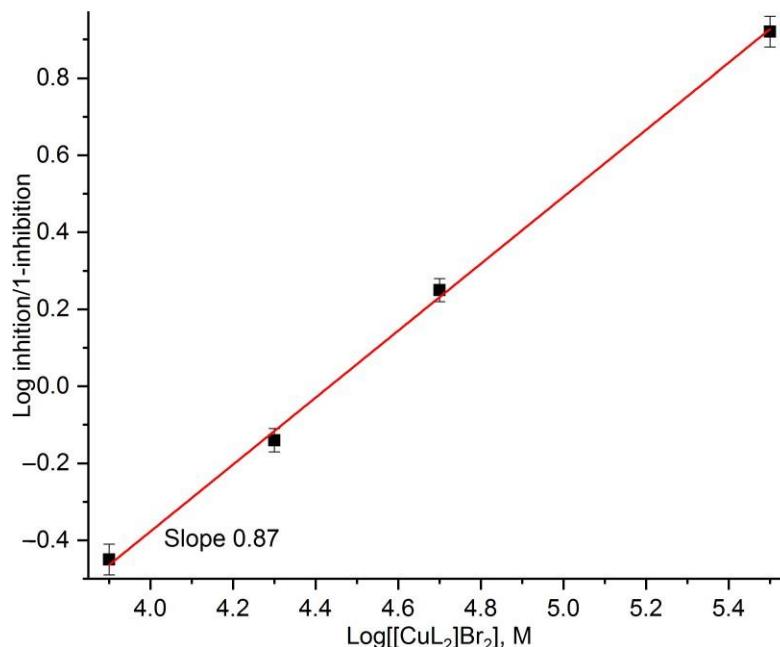


Рисунок 6. Зависимость $\log(\text{inhibition}/(1-\text{inhibition}))$ от $\log([\text{CuL}_2]\text{Br}_2 \text{ concentration})$ (график Хилла), рассчитанная по данным ингибиования светоиндуцированной эволюции кислорода PSII различными концентрациями [CuL₂]Br₂. Реакционная среда и условия измерения описаны в легенде рисунка 1.

3.7. Влияние $[CuL_2]Br_2$ на взаимодействие между PSII и PSI с помощью измерений цепи переноса электронов

Значительное число известных ингибиторов, влияющих на PSII, действуют на его акцепторной стороне, блокируя повторное окисление восстановленного Q_A^- с помощью PSI [70]. Помимо основного сайта действия, многие из них имеют, по крайней мере, еще один дополнительный сайт действия. Действие ингибитора на основной и дополнительный сайты ингибирования наблюдается при разных концентрациях ингибитора. Ингибирование на дополнительном сайте происходит при более высоких концентрациях супрессора [70]. Учитывая вышеизложенную информацию, мы решили проверить, как $[CuL_2]Br_2$ влияет на эффективность светоиндуцированного окисления PSI предварительно восстановленного Q_A^- .

Светоиндуцированное взаимодействие PSI с PSII можно оценить при измерении темновой релаксации фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции хлорофилла PSII (переменная F), связанных с темновым окислением восстановленного Q_A^- с F_m -уровня до уровня F_0 и включении в определенный момент актиничного света 1 (L1), преимущественно возбуждающего PSI ($\lambda > 700$ нм). Спектр пропускания света 1 показан на рисунке 7B.

В этом случае, индуцированном светом 1, наблюдается ускорение Q_A^- повторного окисления. Для

Для сравнения мы использовали DCMU (3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина) и DBMIB (2,5-дибромо-3-метил-6-изопропил-п-бензоинон). DCMU и DBMIB являются доступными, хорошо изученными и наиболее часто и повсеместно используемыми в научных исследованиях ингибиторами. Механизмы ингибирующего действия этих агентов хорошо изучены. DCMU блокирует Q_A^- , окисление пластохиноном (PQ) из мембранныного пула путем связывания вместо PQ с Q_b^- -пластохинон-гербицид-связывающим белком (Q_b^- - сайт D1-белка) реакционного центра PSII [70]. DBMIB блокирует окисление под действием PSI через цитохром (cyt) b6f пластохинола (PQH2) из мембранныго пула PQ [70]. DBMIB связывается с сайтом Qo (Qp) комплекса цитохрома b6f или очень близко к нему [70,71].

Результаты таких экспериментов на тилакоидах показаны на рисунке 7A. В отсутствие каких-либо ингибиторов (контроль, кинетика 1) актинический свет 1 вызывал заметное ускорение Q_A^- окисления. В присутствии DCMU (0,5 мкМ) актинический свет 1 не индуцировал ускорение Q_A^- окисления. Вместо этого, свет 1 индуцировал увеличение PSII флуоресценции хлорофилла (кинетика 2). Это свидетельствует не об окислении Q_A^- , а, наоборот, о восстановлении тех молекул Q_A^- , которые успели окислиться в процессе темновой релаксации флуоресценции до момента включения актиничного света 1. Почему это происходит? Свет 1 возбуждает не только PSI, но и PSII, но в гораздо меньшей степени, поскольку свет 1 содержит ничтожно малую долю света, поглощаемого основными пигментами PSII (рис. 7B). С другой стороны, было показано, что дальний красный свет ограничивает фотохимию PSII в мембранах PSII из шпината до 800 нм, но этот свет имеет существенно сниженную эффективность для PSII [72]. В нашем случае (когда Q_A^- окисление блокировано DCMU) существенно сниженной эффективности актиничного света 1 для PSII достаточно, чтобы индуцировать фотоаккумуляцию восстановленного Q_A^- , и это проявляется в виде увеличения выхода флуоресценции хлорофилла PSII. Влияние DBMIB (7 мкМ) на взаимодействие PSI с PSII, проявляющееся в изменении выхода флуоресценции хлорофилла PSII, практически аналогично эффекту DCMU (рис. 7A кинетика 3). Как и в случае с DCMU, присутствие DBMIB Light 1 вызывает увеличение выхода флуоресценции хлорофилла PSII, но в этом случае увеличение флуоресценции происходит с несколько меньшей скоростью, чем в случае с DCMU. Эти сравнительные эксперименты с DCMU и DBMIB показали, что появление увеличения выхода флуоресценции хлорофилла PSII при освещении светом 1 во время темновой релаксации F_m является надежным указателем на то, что Q_A^- окисление PSI было ингибировано по крайней мере на участке Q_b^- или Qo, и мы можем использовать этот указатель для проверки результатов $[CuL_2]Br_2$.

Исследования влияния $[CuL_2]Br_2$ на взаимодействие PSI с PSII показаны на рисунке 7A кинетика 4. Как видно на этом рисунке, никакого увеличения выхода флуоресценции хлорофилла PSII не происходит в ответ на освещение актиничным светом 1. Наблюдается лишь очень незначительное замедление темнового спада флуоресценции по сравнению с контролем. Следует отметить, что этот эффект (очень незначительное замедление темнового спада флуоресценции) $[CuL_2]Br_2$ наблюдается, когда F_m уже подавлен более чем на 50%.

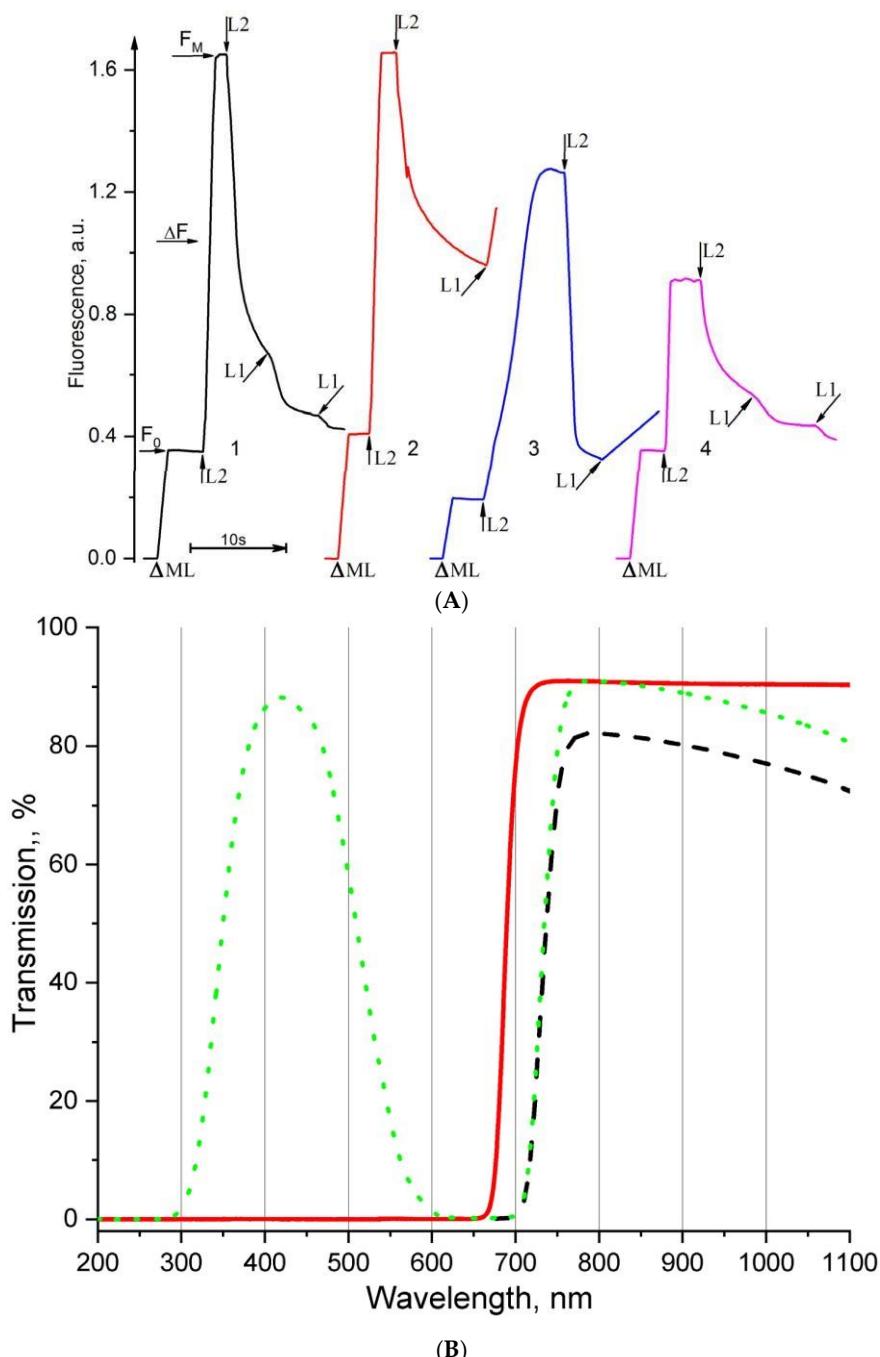


Рисунок 7. (А). Кинетика фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции хлорофилла PSII (ΔF), связанных с фотовосстановлением первичного хинонового акцептора электронов, QA, в тилакоидах шпината в отсутствие каких-либо добавок (кинетика 1) и в присутствии 0,5 мкМ DCMU (кинетика 2), 7 мкМ DBMIB (кинетика 3) и 100 мкМ $[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$ (кинетика 4). Символ треугольника указывает на момент включения измерительного света ($\lambda = 490$ нм, 4 мкмоль фотонов $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), возбуждающего флуоресценцию хлорофилла PSII, F_0 ($\lambda \geq 650$ нм). Стрелки, направленные вверх и вниз с L2, указывают на момент соответствующего включения и выключения актиничного света-2 (L2), возбуждающего обе фотосистемы ($\lambda > 600$ нм, 1000 мкмоль фотонов $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Стрелки, направленные вверх под углом и вниз под углом с L1, обозначают момент соответствующего включения и выключения так называемого света-1 (L1), возбуждающего преимущественно PSI ($\lambda > 707$ нм, 800 мкмоль фотонов $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Концентрация тилакоидов шпината была эквивалентна 20 мкг мл^{-1} хлорофилла. (Б). Спектр пропускания так называемого света 1 (L1), возбуждающего преимущественно PSI (показан черной штриховой линией), был получен комбинацией стеклянных светофильтров Szs20 (показан зеленой точечной линией) плюс KS19 (показан красной линией).

3.8. Влияние $[CuL_2]Br_2$ на внутреннюю флуоресценцию ароматических аминокислот

Многие органические и неорганические вещества могут влиять на структурные и функциональные свойства белков. Повреждение и/или изменение нативной структуры белков, входящих в состав фотосистемных комплексов, или свойств окружающей их среды может быть одной из причин нарушения фотосинтетического переноса электронов и ингибирования фотосинтеза в целом [8-10,13]. Ионы тяжелых металлов и их комплексы, включая ионы Cu и комплексы Cu, также могут действовать подобным образом. Было показано, что медь(II) ингибирует фотосинтетическое выделение кислорода, связываясь с непротонированным остатком белка компонента, очень близкого к системе водорасщепления PSII [73]. При этом такие изменения в белках PSII могут быть вызваны как действием ионов металла в составе металлоорганического комплекса (Cu) [15], так и действием лиганда, являющегося органической частью такого комплекса [8-10,13].

Три аминокислоты с ароматическими круговыми боковыми цепями - фенилаланин, тирозин и особенно триптофан - чувствительны к локальному окружению в белках, и эти ААА претерпевают изменения в длине волны и/или интенсивности их внутренней флуоресценции при любом воздействии на белок [74]. Одним из наиболее доступных и в то же время достаточно надежных и информативных методов обнаружения возможных подобных воздействий на протеины фотосистем является метод регистрации собственной флуоресценции ароматических аминокислот (ААК), входящих в состав белков, но главным образом собственной флуоресценции триптофана и тирозина [59]. Было показано, что некоторые из ранее изученных органических [8-10] и металлоорганических комплексов [15], а также свободные катионы металлов [13], оказывающие ингибирующее действие на фотохимическую активность PSII, также вызывали значительное концентрационно-зависимое снижение интенсивности собственной флуоресценции ароматических аминокислот белка PSII. Можно предположить, что некий негативный эффект (эффекты) изученных $[CuL_2]Br_2$ на нативное состояние и/или структуру белка (белков) PSII является причиной или, по крайней мере, способствует подавлению фотосинтетического выделения кислорода и величины фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции хлорофилла PSII. Поэтому мы решили проверить, влияет ли $[CuL_2]Br_2$ на структуру белков PSII, сравнив параметры собственной флуоресценции ААА в суспензии мембран PSII без и с $[CuL_2]Br_2$. Результаты этих исследований представлены на рис. 8.

На рисунке 8 показаны спектры эмиссии флуоресценции ААА необработанных мембран PSII (спектр 1) и мембран PSII, обработанных $[CuL_2]Br_2$ в разное время (спектры 2, 3). При возбуждении светом с длиной волны 275 нм в эмиссионном спектре наблюдалась широкая полоса с широким максимумом при 330 нм и плечом при 350 нм. Это излучение присущей флуоресценции тирозина, триптофана и фенилаланина [15,75]. Поскольку это флуоресцентное излучение чувствительно к изменениям в локальном окружении вышеуказанных ароматических аминокислот, и если мы предположим, что $[CuL_2]Br_2$ оказывает какое-либо влияние на белки PSII, то можно ожидать изменения интенсивности и/или смещения максимума этой флуоресценции, если нативная конфигурация белков PSII будет нарушена под действием $[CuL_2]Br_2$ или в результате связывания с белками PSII комплекса $[CuL_2]Br_2$ или ионов Cu²⁺, высвобождаемых из $[CuL_2]Br_2$. Известно, что параллельно с уменьшением интенсивности собственной флуоресценции ААА в белке возможно также смещение максимума F. Это указывает на изменение микроокружения флуорофора в результате воздействия фактора [76].

Однако во всех случаях (3 мин и 21 мин инкубации мембран PSII с $[CuL_2]Br_2$ в концентрации 30 мкМ) интенсивность собственной флуоресцентной эмиссии белков PSII в присутствии $[CuL_2]Br_2$ не уменьшалась ни на одной из указанных длин волн (рис. 8 спектры 2, 3). Более того, никаких выраженных сдвигов этой эмиссии не наблюдалось.

максимумов или изменений формы этих спектров не наблюдалось (рис. 8 спектры 2, 3). Это указывает на отсутствие какого-либо влияния $[CuL_2]Br_2$ на нативную структуру белков PSII или отсутствие связывания $[CuL_2]Br_2$ с каким-либо белком PSII.

Кроме того, в этом диапазоне длин волн не наблюдалось новых полос флуоресценции, что может указывать на возможное образование комплекса между $[CuL_2]Br_2$ и белками PSII. Аналогичные результаты были получены

в присутствии $[CuL_2]Br_2$ в концентрации 90 мкМ, вызывая почти полное подавление фотохимической активности PSII (не показано).

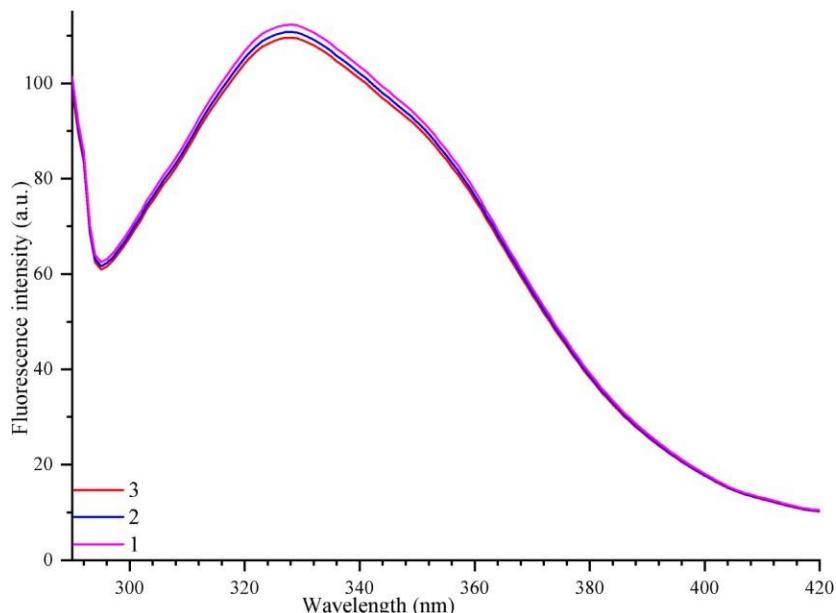


Рисунок 8. Спектры эмиссии собственной флуоресценции ароматических аминокислот (в основном Trp, Tug) компонентов белков PSII в суспензии мембран PSII без (1) и с 30 мкМ $[CuL_2]Br_2$ (2, 3), измеренные после инкубации мембран PSII с $[CuL_2]Br_2$ в темноте в течение 3 мин.

(2) и 21 мин (3). Длина волны возбуждения 275 нм. Эмиссия флуоресценции регистрировалась в диапазоне от 290 нм до 420 нм. Концентрация ДМСО во всех образцах была такой же, как в контроле (не более 1%). Концентрация мембран PSII была эквивалентна 10 мкг мл⁻¹ хлорофилла.

4. Обсуждение

Поскольку фотосинтетическая эволюция кислорода за счет мембран PSII не наблюдается в отсутствие искусственных акцепторов электронов, но в присутствии исследуемого агента в концентрации 0,1 мМ (Рисунок 2, кинетика 6), можно заключить, что исследуемый агент $[CuL_2]Br_2$ (или, например, его предполагаемая окисленная форма), очевидно, не способен действовать как экзогенный акцептор электронов PSII. Эти результаты можно рассматривать как указание на то, что катион меди в комплексе достаточноочно прочно связан с лигандром, а заряд на катионе меди уравновешен общим зарядом на лигандре, достаточным для предотвращения возможного взаимодействия катиона меди с другими компонентами среды в качестве акцептора электронов. Наблюдавшаяся ранее стимуляция фотосинтетического выделения кислорода под действием Cu²⁺ в низких концентрациях [61,62] может быть обусловлена тем, что Cu²⁺ функционирует как разобщитель при этой концентрации, как было предложено ранее [35] на основании стимуляции общей скорости переноса электронов низкой концентрацией Cu²⁺, по крайней мере, в случае ветвей *Lettia* [61]. В тилакоидах (закрытых мембранных везикулах - органеллах хлоропластов, растительных клеток) перенос электронов сопряжен с переносом протонов извне (строма) внутрь тилакоида (просвет) с образованием протонного градиента. Разрыхлители нарушают сопряжение между переносом электронов и образованием протонного градиента, и вся энергия используется только для переноса электронов. Мембранны PSII представляют собой открытые фрагменты мембраны грана, а не цельномембранные везикулы. Поэтому в мембранных PSII не образуется протонный градиент. Следовательно, uncouplers не влияют на эффективность переноса электронов в мембранных PSII, так как этому есть место в тилакоидах. Снижение скорости фотосинтетического выделения кислорода в мембранных PSII в присутствии экзогенных акцепторов электронов наблюдается при наличии $[CuL_2]Br_2$ в среде измерения; это может свидетельствовать о том, что $[CuL_2]Br_2$ ингибит функциональную активность некоторых компонентов

электротранспортной цепи PSII. Однако можно также предположить, что наблюдаемый эффект является результатом прямого химического взаимодействия между AEA-s и $[CuL_2]Br_2$ (например, окисление AEA-s под действием $[CuL_2]Br_2$).

что приводит к истощению концентраций АЕА-с и, как следствие, к снижению скорости выделения кислорода. Можно предположить, что таким АЕА в используемой паре АЕА-с может быть каждый из этих агентов или один из них: DCBQ или FeCN. Если сравнить потенциалы веществ, окисляемых катионом Cu(II): аскорбат $E_{m,7} = +60$ мВ [77]; 1,5-дифенилкарбазид $E_{m,7} = -300$ мВ [78]; глутатион $E_{m,7} = -240$ мВ [79]; NADH $E_{m,7} = -320$ мВ [77]; DCBQ $E_{m,7} = +309$ мВ [80] и FeCN $E_{m,7} = +420$ мВ [81], то получается, что

очевидно, что таким АЭА может быть DCBQ, а не FeCN. С другой стороны, было показано, что редокс-потенциал Cu(II) в комплексе может отличаться от восстановительного потенциала аквапары Cu(II) Cu(I) (164 мВ) [82] и быть значительно более положительным [83], например, включая ряд медных белков: Рустацианин (бактерии) 680 мВ; Пласто-цианин (растения) 370 мВ; Амицианин (бактерии) 294 мВ; Стеллацианин (растения) 285 мВ; Азурин (бактерии) 276 мВ [84]. Принимая во внимание эти данные, можно предположить, что FeCN также может быть обеднен в результате прямого химического взаимодействия с $[CuL_2]Br_2$. Однако против этого предположения свидетельствуют следующие экспериментальные факты: (1) отсутствие изменений в спектрах поглощения как FeCN, так и $[CuL_2]Br_2$ после смешивания и совместного инкубирования в течение достаточного времени в условиях измерения скорости фотосинтетического выделения кислорода, но в отсутствие мембран PSII (не показано); (2) $[CuL_2]Br_2$ не имеет никакого

полосы поглощения в красной области спектра ($\lambda > 650$ нм) (не показано). Таким образом, $[CuL_2]Br_2$ концентрационно-зависимое снижение скорости фотосинтетического кислорода.

Гипотеза о том, что снижение фотосинтетического выделения кислорода мембранными PSII является следствием прямого взаимодействия $[CuL_2]Br_2$ с DCBQ или FeCN, может быть проверена путем увеличения концентрации FeCN и/или DCBQ. Если эффективность ингибиции не изменится, то это будет свидетельствовать против вышеуказанного предложения. Однако концентрация FeCN уже достаточно высока (1 мМ), выше которой вполне можно ожидать неспецифического воздействия FeCN на PSII-мембранны. С другой стороны, не рекомендуется использовать DCBQ в концентрациях выше 250-300 мкМ. На основании экспериментальных данных предполагается, что DCBQ, принимая электрон от восстановленного вида в PSII, может затем отдать его на P_{680}^+ или Turg ; а ферроцианид предотвращает этот процесс путем окисления восстановленного DCBQ [85]. Поэтому для предотвращения накопления восстановленного DCBQ требуется добавление FeCN [56,86]. В то же время другие авторы, например [38], измеряли активность выделения кислорода мембранными PSII (500 мкмоль O_2 мг Хл-1 ч-л) в присутствии DCBQ (без FeCN). Можно предположить, что $[CuL_2]Br_2$ действует как экзогенный донор электронов, способный конкурировать с эндогенным ОЕС за положительные эквиваленты из RC и, следовательно, за способность поставлять электроны для восстановления пары DCBQ + FeCN, не напрямую в результате прямой химической реакции, а через компоненты RC. Это могло бы проявляться в виде снижения скорости светоиндуцированной эволюции кислорода при увеличении концентрации $[CuL_2]Br_2$. Однако приведенные выше косвенные данные об окислительно-восстановительных свойствах акваионов Cu²⁺ и влиянии на них органических лигандов делают это предположение маловероятным. Тот факт, что степень ингибиции скорости выделения фотосинтетического окси-гена мембранными PSII не зависит от времени инкубации в присутствии $[CuL_2]Br_2$ в темноте (эффект, измеренный через 3 мин, равен эффекту через 21 мин), указывает на то, что $[CuL_2]Br_2$ достаточно быстро достигает цели, по-видимому, локализуясь в гидрофобной области пигмент-белкового комплекса PSII. Это предположение подтверждается также тем, что $[CuL_2]Br_2$ очень плохо растворим в водной среде, поэтому основной раствор $[CuL_2]Br_2$ был приготовлен в ДМСО. Исходя из вышеизложенных рассуждений, мы склонны предположить, что снижение скорости фотосинтетического выделения кислорода мембранными PSII, наблюдаемое в присутствии $[CuL_2]Br_2$, является результатом ингибиции $[CuL_2]$

]Вг₂ функциональной активности какого-либо компонента электротранспортной цепи PSII. Ранее [87] было показано, что ингибиование выделения кислорода PSII, индуцированное Cu(II), обратимо в присутствии Cu(II)-хелатирующего агента (ЭДТА), но обратимость сильно зависит от времени инкубации с Cu(II) на свету. Всего 30 с освещения в присутствии Cu(II) достаточно для ингибиции PSII катионом, и оно будет полностью необратимым под действием ЭДТА.

Максимальный квантовый фотохимический выход PSII в адаптированных к темноте образцах $\phi_{\text{Ро}} = F_v/F_m$, равный $0,79 \pm 0,02$, свидетельствует о том, что фотохимическая активность PSII в использованных мембранах PSII достаточно высока, и эти мембранны PSII могут быть использованы для изучения ингибирующего действия $[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$ на PSII. Эффективное снижение F_m , вызванное $[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$, может быть связано с тем, что (а) не происходит разделения и стабилизации зарядов в РЦ; (б) из-за ингибирования функционирования некоторых компонентов ОЭК не поступают электроны из ОЭК через РЦ к Q_A , необходимые для фотоаккумуляции восстановленного Q_A , и, следовательно, F_m не может достичь уровня, как в контроле; (с) $[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$ действует как экзогенный акцептор электронов, который удаляет электрон из Q_A более эффективно, чем ОЕС поставляет электроны в Q_A и поэтому фотоаккумуляция восстановленного Q_A не происходит, и это проявляется в виде снижения F_m . (с) $[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$ является тушителем возбужденных состояний хлорофилла, и это проявляется в виде тушения флуоресценции хлорофилла. Рассмотрим эти предположения в обратном порядке.

(д) $[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$ только избирательно снижает интенсивность переменной флуоресценции хлорофилла (F_v) и не влияет на уровень F_0 (рис. 3). Учитывая тот факт, что $[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$ не снижает уровень F_0 , а также отсутствие полос поглощения $[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$ в диапазоне спектра эмиссии флуоресценции хлорофилла (не показано), предположение, что $[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$ действует как тушитель флуоресценции, кажется маловероятным.

(с) Если $[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$ действует как очень эффективный экзогенный акцептор электронов, то (1) темновой спад F_v , отражающий скорость реокисления восстановленного Q_A , может быть значительно ускорен; (2) скорость фотоиндуцированного роста F_m могла бы снизиться; (3) мы могли бы наблюдать светоиндуцированное выделение кислорода в отсутствие экзогенных акцепторов электронов; (4) могли бы произойти спектральные изменения в спектре поглощения $[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$, указывающие на образование восстановленной формы этого агента. Однако ничего из вышеперечисленного не происходит (рис. 2 и 3). Таким образом, $[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$ не действует как акцептор электронов.

(б) Можно предположить, что $[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$ включается где-то на стороне донора или между его компонентами и блокирует и/или замедляет нормальное донорство электронов и/или действует как экзогенный "бедный" донор электронов для РЦ, не способный обеспечить эффективную фотоаккумуляцию восстановленного Q_A . Однако отсутствие замедления скорости роста F_m в присутствии $[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$ (рис. 3 кинетика 2-4), и особенно неспособность экзогенных доноров электронов преодолеть ингибирование $[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$ и таким образом восстановить F_m до исходного уровня (не показано), свидетельствует против того, что донорная сторона является местом ингибирующего действия этого агента. Кроме того, косвенные данные о редокс-свойствах $[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$, рассмотренные выше, также свидетельствуют против этого предположения.

(а) Таким образом, основным местом ингибирующего действия $[\text{CuL}_2]\text{Br}_2$, скорее всего, являются компоненты реакционного центра PSII. Это предположение достаточно убедительно подтверждается всеми рассмотренными выше соображениями, отвергающими другие сайты действия этого агента на PSII. Кроме того, как было рассмотрено во введении, наиболее вероятным и наиболее экспериментально обоснованным основным сайтом действия среди нескольких вспомогательных сайтов действия как водных ионов Cu^{2+} , так и металлоорганических комплексов на основе Cu^{2+} , по-видимому, являются компоненты реакционного центра PSII.

Рассчитанный IC_{50} (30 мкМ) при концентрации хлорофилла в мембранах PSII 20 мкг мл⁻¹ вполне сопоставим с данными, полученными другими авторами. Значение(и) IC_{50} ингибирования активности выделения кислорода PSII под действием CuCl_2 (1) в хлоропластах шпината при концентрации Хл 20 мкг мл⁻¹ составило 18-20 мкМ [36]; в присутствии DCBQ или феррицианида эти значения составили, соответственно, 6,6 мкМ и 20,7 мкМ при концентрации Хл 6,66 мкг мл⁻¹ или 19 мкг мл⁻¹ в мембранах PSII и тилакоидах, соответственно [39]; в мембранах PSII

при концентрации Хл 20 мкг мл⁻¹ - 8-10 мкМ [41]; в мембранах PSII при концентрации Хл 10 мкг мл⁻¹ - 7 мкМ [88]. Ингибирующая активность моногидрата диаква-(N-пирувиден-β-аланинато) меди(II) (Cu(руг-β-ala)), выраженная значением IC₅₀, по сравнению с контрольными образцами, составила 136 мкМ при концентрации хлорофилла, равной 30 мкг мл⁻¹ [15]. Ki (16 мкМ), -logKi (4,8) и xt равны одной молекуле [CuL₂]Br₂ на одну молекулу хлорофилла, или 220-250 молекул ингибитора на одну реакцию PSII,

отличаются от данных DCMU: 1 молекула DCMU на примерно 300 молекул хлорофилла [67,68], но сравнимо с данными для мощного ингибитора фотосинтеза, 4,6-динитро-о-крезола (DNOC): 1 сайт связывания на 2,3 молекулы хлорофилла [68]. Значения K_i для ингибирования активности выделения кислорода водными ионами Cu^{2+} (в виде $CuCl_2$) или DCMU в присутствии 0,5 мМ DCBQ в качестве искусственного акцептора электронов, полученные Yruela et al. в 1992 году [38], составили 5,88 (5,32) мкМ и 0,023 мкМ, соответственно. Что касается сайта связывания $[CuL_2]Br_2$, то данные о том, что $[CuL_2]Br_2$ независимо связывается только с одним сайтом связывания на молекулу акцептора, являются аналогичным выводом, который был сделан для ингибитора 4,6-динитро-о-крезола [68]. Сравнивая эффекты DCMU и $[CuL_2]Br_2$ на взаимодействие PSI с PSII (рис. 7A), можно приблизительно оценить, что эффект $[CuL_2]Br_2$ составляет не более 5-10% от эффекта DCMU. Сравнивая эффекты $[CuL_2]Br_2$ на F_M (50%) и на взаимодействие PSI с PSII (см. выше), можно предположить, что последний эффект, вероятно, является дополнительным, а не основным. Существование дополнительных участков (эффектов) к основному известно, что предполагается и экспериментально показано для многих ингибиторов фотосинтеза [6,70], включая аква-ионы Cu^{2+} [50,89]. Используя различные методы, были отмечены дополнительные эффекты диурона (1,1-диметил, 3-(3',4'-дихлорфенил) мочевины) [90-94], диносеба (6-секбутил-2,4-динитрофенол) [58,95] и другого фенольного ингибитора TNP (2,4,6-тринитрофенол) [96] на донорной стороне PSII. Идентифицирован DBMIB (2,5-дibromo-3-метил-6-изопропилбензохинон), как сильный тушитель возбужденного состояния хлорофилла в антенне PSII [97]. Более того, разные авторы часто указывают совершенно разные локусы в качестве основных локусов всех выявленных сайтов связывания (эффектов и механизмов действия) для одного и того же ингибитора. Доминирование тех или иных эффектов (как на донорной, так и на акцепторной стороне PSII) зависит от концентрации ингибитора и биологического образца [67].

Отсутствие каких-либо изменений в спектрах флуоресценции AAA в присутствии $[CuL_2]Br_2$ по сравнению с контролем (включая концентрации $[CuL_2]Br_2$, при которых фо-тоиндуцированный перенос электронов в PSII почти полностью подавлен, особенно при длительной инкубации в присутствии $[CuL_2]Br_2$) свидетельствует о том, что (1) ни весь комплекс $[CuL_2]Br_2$, ни ион меди, который может высвобождаться из этого комплекса, не оказывали существенного влияния на нативное состояние белков AAA PSII; (2) и, следовательно, очевидно, не происходит высвобождения иона меди из комплекса $[CuL_2]Br_2$. Ранее было показано, что ряд водорастворимых металлоорганических комплексов на основе $Cu(II)$ эффективно гасят собственную флуоресценцию AAA белков PSII. На основании этих и других данных было доказано, что ионы меди высвобождаются из этих комплексов и связываются с триптофаном и тирозином, тем самым ингибируя функционирование компонентов донорной стороны PSII [15]. Эти комплексы, в их случае, служили своеобразным средством доставки ионов меди к месту действия. Это одна из наиболее вероятных общих задач и ролей соответствующих органических лигандов в составе металлоорганических комплексов. Сочетание ионов металлов с соответствующими органическими лигандами позволяет получать комплексы, которые не только сохраняют исходную биологическую активность ионов металлов, но и обладают высокой растворимостью в соответствующей среде и способностью доставлять ионы металла к месту его действия практически в состоянии исходной биологической активности.

На основании полученных экспериментальных данных можно предположить, что местом действия $[CuL_2]Br_2$ является компонент реакционного центра PSII. Эти данные согласуются с тем, что аква-ионы $Cu(II)$ также действуют на компоненты РЦ PSII [45]. На первый взгляд, нелегко представить, как относительно большая молекула $[CuL_2]Br_2$ может проникнуть в компоненты РЦ, расположенные в относительно плотно упакованной и гидрофобной области РЦ. Однако, с одной стороны, $[CuL_2]Br_2$ сам является высокогидрофобным соединением (см. выше), а с другой стороны, теоретически обосновано и

экспериментально показано, что РЦ в целом и его отдельные белковые компоненты претерпевают многочисленные конформационные изменения в процессе функционирования, а также при различных обратимых и необратимых воздействиях [98-105]. С учетом этих данных предположение о том, что компоненты РЦ являются объектом ингибирования $[CuL_2]Br_2$, представляется вполне реалистичным. Данные об отсутствии тушения собственной флуоресценции AAA $[CuL_2]Br_2$ нисколько не противоречат предположению, что местом действия $[CuL_2]Br_2$ является РЦ. Существуют данные кругового дихроизма, что

показывают, что даже в случае значительного тушения собственной флуоресценции AAA водными ионами Cu²⁺ вследствие их связывания с красным флуоресцентным белком (DsRed) или его производными, не было выявлено влияния связывания Cu²⁺ на вторичную структуру или конформацию этих белков [106].

5. Выводы

В соответствии с целью работы - исследовать возможные эффекты нового металлоорганического комплекса, (CuL₂]Br₂) PSII, (1) несколько различных интересных эффектов были идентифицированы и изучены на уровне различных областей PSII. (2) Было подтверждено предположение, что присутствие лиганда значительно изменяет возможный сайт и механизм ингибирующего действия ионов меди. Экспериментальные данные на момент написания этой статьи можно объяснить тем, что возможным механизмом ингибирования могут быть некоторые конформационные изменения в структуре реакционного центра вследствие его взаимодействия с ингибирующим агентом, особенно во время фотоаккумуляции. Для выяснения точного механизма и места ингибирующего действия этого агента планируется значительно расширить перечень методов исследования и типов биологических образцов, а также применить метод стабилизации структуры реакционного центра. Полученные результаты могут быть использованы при разработке методов гарантированной доставки активного элемента к месту его основной активности в органическом комплексе.

Вклад авторов: S.K.Z., V.D.K., S.A. и S.I.A. задумали и разработали дизайн исследования; M.S.K., H.K. и K.B.A. синтезировали комплексы, C.K.Z., M.C.C. и M.V.R. провели эксперименты; C.K.Z., I.M.X., V.D.K., C.A. и C.I.A. написали рукопись. Все авторы участвовали в оценке и интерпретации данных. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (19-14-00118) С.К.З., В.Д.К. и С.И.А., М.С.С. поддержаны грантом АзСФ (ЕИ'F-GAT-6-2021-2(39)-13/06/3-М-06). Рисунок 7 получен в рамках государственного контракта Министерства науки и высшего образования РФ (проект № 122050400128-1). С.А. выражает благодарность за поддержку программы стипендий для выдающихся ученых, Университет короля Сауда, Саудовская Аравия.

Заявление Совета по институциональному надзору: Не применимо.

Заявление об информированном согласии: Никаких конфликтов, информированного согласия, прав человека или животных.

Заявление о доступности данных: Данные, представленные в этом исследовании, доступны по запросу у соответствующих авторов.

Ссылки

Конфликты интересов: Авторы заявляют, что у них нет известных конкурирующих финансовых интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в данной статье.

1. Ахмад, Н.; Мухтар, З. Генетические манипуляции в сельскохозяйственных культурах: Challenges and Opportunities. *Genomics* **2017**, *109*, 494–505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
2. Шютте, Г.; Эккерсторфер, М.; Раствелли, В.; Райхенбехер, В.; Рестрепо-Вассалли, С.; Руохонен-Лехто, М.; Сауси, А.Г.В.; Мертенс, М. Устойчивость к гербицидам и биоразнообразие: Агрономические и экологические аспекты генетически модифицированных растений, устойчивых к гербицидам. *Environ. Sci. Eur.* **2017**, *29*, s12302-s123016. [[CrossRef](#)].
3. Нельсон Н., Юнге В. Структура и перенос энергии в фотосистемах кислородного фотосинтеза. *Annu. Rev. Biochem.* **2015**, *84*, 659–683. [[CrossRef](#)]
4. Васс, И. Молекулярные механизмы фотоповреждения в комплексе фотосистемы II. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2012**, *1817*, 209–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
5. Pospíšil, P. Производство реактивных кислородных соединений фотосистемой II в ответ на световой и температурный стресс. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1950. [[CrossRef](#)].
6. Жармукамедов С.К., Аллахвердиев С.И. Химические ингибиторы фотосистемы II. *Русс. Ж. Физиол. растений.* **2021**, *68*, 212–227. [[CrossRef](#)].
7. Семелкова Л.; Конецна К.; Патерова П.; Кубичек В.; Кунес Й.; Новакова Л.; Марек Й.; Наесенс Л.; Пешко М.; Кралова К.; и др. Синтез и биологическая оценка N-алкил-3-(алкиламино)-пиразин-2-карбоксамидов. *Molecules* **2015**, *20*, 8687–

- 8680 Jampilek, J.; Kralova, K.; Pesko, M.; Kos, J. Ring-Substituted 8-Hydroxyquinoline-2-Carboxanilides as Photosystem II Inhibitors. Биоорганическая медицина. *Chem. Lett.* **2016**, 26, 3862-3865. [CrossRef].

9. Gonec, T.; Kralova, K.; Pesko, M.; Jampilek, J. Antimycobacterial N-Alkoxyphenylhydroxynaphthalene carboxamides Affecting Photosystem II. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 1881-1885. [[CrossRef](#)].
10. Gonec, T.; Kos, J.; Pesko, M.; Dohanosova, J.; Oravec, M.; Liptaj, T.; Kralova, K.; Jampilek, J. Halogenated 1-Hydroxynaphthalene-2-Carboxanilides Affecting Photosynthetic Electron Transport in Photosystem II. *Molecules* **2017**, *22*, 1709. [[CrossRef](#)].
11. Карабан М.С., Родионова М.В., Тунч Т., Венедик К.Б., Мамас, С., Шитов А.В., Жармухамедов С.К., Клинов В.В., Карабан Н., Аллахвердиев С.И. Характеристика девятнадцати комплексов сурьмы(III) как мощных ингибиторов фотосистемы II, карбоновой ангидразы и глутатионредуктазы. *Photosynth. Res.* **2016**, *130*, 167-182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
12. Karki, L.; Lakshmi, K.V.; Szalai, V.A.; Brudvig, G.W. Низкотемпературный контроль оборота фотосистемы II с помощью новых металл-содержащих редокс-активных гербицидов. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5180-5188. [[CrossRef](#)].
13. Сантилло С., Мориелло А.С., Ди Майо В. Электрофизиологическая изменчивость в клеточной линии SH-SY5Y. *Ген. физиол. биофиз.* **2014**, *33*, 121-129. [[CrossRef](#)]
14. Карабан М.С., Жармухамедов С.К., Мамас, С., Куприянова Е.В., Шитов А.В., Клинов В.В., Озбек Н., Озмен У., Гюндюзальп А., Шмитт Ф.-Ж. и др. Скрининг новых химических соединений как возможных ингибиторов карбоновой ангидразы и фотосинтетической активности фотосистемы II. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2014**, *137*, 156-167. [[CrossRef](#)].
15. Sersen, F.; Kral'ova, K.; Bumbalova, A.; Svajlenova, O. The Effect of Cu(II) Ions Bound with Tridentate Schiff Base Ligands upon the Photosynthetic Apparatus. *J. Plant Physiol.* **1997**, *151*, 299-305. [[CrossRef](#)].
16. Родионова М.В., Жармухамедов С.К., Карабан М.С., Венедик К.Б., Шитов А.В., Тунч Т., Мамас, С., Креславский В.Д., Карабан Н., Клинов В.В. и др. Оценка новых комплексов Cu(II) как нового класса ингибиторов карбоновой ангидразы растений, глутатионредуктазы и фотосинтетической активности в фотосистеме II. *Photosynth. Res.* **2017**, *133*, 139-153. [[CrossRef](#)].
17. Андерегг, Г. Критический обзор констант стабильности комплексов ЭДТА. Критическая оценка констант равновесия в растворе: Стабильность Константы комплексов металлов, 1-е изд.; Международный союз теоретической и прикладной химии (IUPAC), Pergamon Press: Oxford, UK; New York, NY, USA; Paris, France; Frankfurt, Germany, 1977; ISBN 978-0-08-022009-3, eBook ISBN: 9781483137940. [[CrossRef](#)].
18. Martell, A.E.; Smith, R.M. *Critical Stability Constants*; Springer: New York, NY, USA, 1982; pp. 1-604, ISBN 978-1-4615-6761-5.
19. Смит Р.М., Мартелл А.Е. Критические константы стабильности: Второе дополнение; Springer: New York, NY, USA, 1989; pp. 1-647, ISBN 978-1-4615-6764-6.
20. Гуд Н.Е., Вингет Г.Д., Винтер В., Конолли Н.Т., Изава С., Сингх Р.М.М. Ионно-водородные буферы для биологических исследований. *Биохимия* **1966**, *5*, 467-477. [[CrossRef](#)]
21. Вайсбергер А., Лувалле Ж.Е. Окислительные процессы. XVII. Автоокисление аскорбиновой кислоты в присутствии меди. *J. Am. Chem. Soc.* **1944**, *66*, 700-705. [[CrossRef](#)].
22. Андерсон, Дж. Х. Катализируемое медью окисление гидроксиламина. *Analyst* **1964**, *89*, 357-362. [[CrossRef](#)].
23. Келлер, Р.Н.; Бркофф, Х.Д. Хлорид меди(I). In *Inorganic Syntheses*; Fernelius, W.C., Ed.; McGraw-Hill Book Company, Inc: New York, NY, USA, 1946; pp. 1-4, ISBN 9780470131619.
24. Балт С., Ван Дален Э. Реакции дифенилкарбазида и дифенилкарбазона с катионами. *Anal. Chim. Acta* **1963**, *29*, 466-471. [[CrossRef](#)].
25. Креспо Г.А., Андраде Ф.Х., Иньюн Ф.А., Тудино М.Б. Кинетический метод определения следовых количеств меди(II) в водных матрицах по ее каталитическому влиянию на окисление 1,5-дифенилкарбазида. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *539*, 317-325. [[CrossRef](#)].
26. Oikawa, S.; Kawanishi, S. Site-Specific DNA Damage Induced by NADH in Presence of Copper(II): Роль активных видов кислорода . *Biochemistry* **1996**, *35*, 4584-4590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
27. Yuan, X.; Pham, A.N.; Miller, C.J.; Waite, T.D. Катализируемое медью окисление гидрохинона и связанный с ним окислительно-восстановительный цикл меди в условиях, типичных для природных соленых вод. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 8355-8364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
28. Лопес-Куэто, Л., Касадо-Риобо, Х.А. Каталитическое действие меди на окислительно-восстановительную реакцию гексацианоферрат(III)-цианид - I. Некатализируемые и катализируемые реакции . *Талант* **1979**, *26*, 127-132. [[CrossRef](#)].
29. Флемминг К.А., Треворс Дж.Т. Токсичность и химия меди в окружающей среде: A Review. *Water Air Soil Pollut.* **1989**, *44*, 143-158. [[CrossRef](#)].
30. Гарридо-Баррос, П.; Гимберт-Суриньяк, К.; Matey, P.; Сала, Х.; Ллобет, А. Как сделать эффективный и надежный молекулярный катализатор для окисления воды. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 6088-6098. [[CrossRef](#)].
31. Matheu, R.; Garrido-Barros, P.; Gil-Sepulcre, M.; Ertem, M.Z.; Sala, X.; Gimbert-Suriñach, C.; Llobet, A. The Development of Molecular Water Oxidation Catalysts. *Nat. Rev. Chem.* **2019**, *3*, 331-341. [[CrossRef](#)].
32. Килпин К.Дж., Дайсон П.Дж. Ингибирование ферментов комплексами металлов: Концепции, стратегии и применение. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1410. [[CrossRef](#)].
33. Ким В.С. Замена магния медью в хлорофиллах и бактериохлорофиллах. *Z. Naturforsch. B* **1967**, *22*, 1054-1061. [[CrossRef](#)].
34. Vierke, G.; Struckmeier, P. Связывание меди(II) с белками фотосинтетической мембранны и его корреляция с ингибированием транспорта электронов в хлоропластах II класса шпината. *Z. Fur Naturforsch. Sect. C J. Biosci.* **1977**, *32*, 605-

-
- 2680 610. [[CrossRef](#)].
35. Samuelsson, G.; Öquist, G. Воздействие хлорида меди на фотосинтетический транспорт электронов и хлорофилл-белковые комплексы Spinacia Oleracea. *Физiol. клетки растений*. **1980**, *21*, 445-454. [[CrossRef](#)].
36. Hsu, B.D.; Lee, J.Y. Токсическое воздействие меди на фотосистему II хлоропластов шпината. *Физiol. растений*. **1988**, *87*, 116-119.
[[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].

37. Shioi, Y.; Tamai, H.; Sasa, T. Ингибиование фотосистемы II в зеленой водоросли *Ankistrodesmus Falcatus* медью. *Физиол. Растение.* 1978, 44, 434-438. [CrossRef]
38. Yruela, I.; Montoya, G.; Picorel, R. Механизм ингибиования Cu(II) транспорта электронов фотосистемы II у высших растений. *Photosynth. Res.* 1992, 33, 227-233. [CrossRef].
39. Yruela, I.; Montoya, G.; Alonso, P.J.; Picorel, R. Identification of the Pheophytin-QA-Fe Domain of the Reducing Side of the Photosystem II as the Cu(II)-Inhibitory Binding Site. *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 22847-22850. [CrossRef].
40. Yruela, I.; Alfonso, M.; De Zarate, I.O.; Montoya, G.; Picorel, R. Точное расположение Cu(II)-ингибирующего сайта связывания в фотосинтетических реакционных центрах высших растений и бактерий по изменениям поглощения, вызванным светом. *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 1684-1689. [CrossRef].
41. Ренгер Г., Глейтер Х.М., Хааг Э., Рейфарт Ф. Фотосистема II: термодинамика и кинетика переноса электронов от QA- к QB(QB-) и пагубное влияние меди(II). *Z. Fur Naturforsch. Sect. C J. Biosci.* 1993, 48, 234-240. [CrossRef].
42. Шредер В.П., Ареллано Ж.Б., Биттнер Т., Барон М., Экерт Х.Ж., Ренгер Г. Исследования взаимодействия меди с фотосистемой II в высших растениях с помощью спектроскопии поглощения, вызванной вспышкой. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 32865-32870. [CrossRef].
43. Jegerschold, C.; Arellano, J.B.; Schröder, W.P.; van Kan, P.J.M.; Barón, M.; Styring, S. Copper(II) Inhibition of Electron Transfer through Photosystem II Studied by EPR Spectroscopy. *Biochemistry* 1995, 34, 12747-12754. [CrossRef].
44. Yruela, I.; Rueyo, J.J.; Alonso, P.J.; Picorel, R. Фотоингибиование фотосистемы II высших растений: Влияние ингибиции медью. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 27408-27415. [CrossRef].
45. Yruela, I.; Gatzen, G.; Picorel, R.; Holzwarth, A.R. Cu(II)-Inhibitory Effect on Photosystem II from Higher Plants. Пикосекундное исследование флуоресценции с временным разрешением. *Biochemistry* 1996, 35, 9469-9474. [CrossRef].
46. Sabat, S.C. Ингибиование ионом меди активности электронного транспорта в частице фотосистемы II, промытой хлоридом натрия, частично предотвращается ионом кальция. *Z. Fur Naturforsch. Sect. C J. Biosci.* 1996, 51, 179-184. [CrossRef].
47. Král'ová, K.; Sersen, F.; Blahová, M. Влияние комплексов Cu(II) на фотосинтез в хлоропластах шпината. Комплексы аква(арилоксиацетато)меди(II). *Gen. Physiol. Biophys.* 1994, 13, 483-491.
48. Бурда К., Крук Й., Шмид Г.Х., Стржалка К. Ингибиование эволюции кислорода в фотосистеме II ионами Cu(II) связано с окислением цитохрома B559. *Biochem. J.* 2003, 371, 597-601. [CrossRef].
49. Барон М., Ареллано Ж.Б., Горге Ж.Л. Медь и фотосистема II: противоречивые отношения. *Физиол. Plant.* 1995, 94, 174-180. [CrossRef]
50. Ируэла, И. Медь в растениях. *Braz. J. Plant Physiol.* 2005, 17, 145-156. [CrossRef]
51. Хоробрых С.А., Иванов Б.Н. Восстановление кислорода в пластохиноновом пуле изолированных тилакоидов гороха. *Photosynth. Res.* 2002, 71, 209-219. [CrossRef].
52. Бертольд Д.А., Бэбкок Г.Т., Йокум К.Ф. Препарат высокоразрешенной, эволюционирующей под действием кислорода фотосистемы II из тилакоидных мембран шпината. *FEBS Lett.* 1981, 134, 231-234. [CrossRef].
53. Форд Р.К., Эванс М.К.В. Изоляция препарата фотосистемы 2 из высших растений с высокообогащенной активностью по выделению кислорода. *FEBS Lett.* 1983, 160, 159-164. [CrossRef].
54. Климов В.В., Аллахвердиев С.И., Шувалов В.А., Красновский А.А. Влияние экстракции и повторного добавления марганца на световые реакции препаратов фотосистемы-II. *FEBS Lett.* 1982, 148, 307-312. [CrossRef].
55. Арнон, Д.И. Ферменты меди в изолированных хлоропластах. Полифенолоксидаза в Beta Vulgaris. *Физиол. растений.* 1949, 24, 1-15. [CrossRef].
56. Xiong, J.; Minagawa, J.; Crofts, A. Govindjee Loss of Inhibition by Formate in Newly Constructed Photosystem II D1 Mutants, D1-R257E and D1-R257M, of *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1998, 1365, 473-491. [CrossRef].
57. Денненберг Р.Дж., Юрсиник П.А., Маккарти С.А. Неповрежденность кислородно-эволюционной системы в тилакоидах и частицах фотосистемы II. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1986, 852, 222-233. [CrossRef].
58. Климов В.В., Аллахвердиев С.И., Жармухamedов С.К. Окислительно-восстановительные взаимодействия фенольного гербицида диносеба и пары хлорофилл-Р680-феофитин [P680(+)-РР(-)] в реакционном центре фотосистемы-II растений. *Sov. Физиол. растений.* 1989, 36, 633-640.
59. Servusová, B.; Eibinová, D.; Doležal, M.; Kubíček, V.; Paterová, P.; Peško, M.; Král'ová, K. Substituted N-Benzylpyrazine-2-Carboxamides: Синтез и биологическая оценка. *Molecules* 2012, 17, 13183-13198. [CrossRef].
60. Так, Д.Г. Прямой электрохимический синтез неорганических и металлоорганических соединений. *Pure Appl. Chem.* 1979, 51, 2005-2018. [CrossRef].
61. Prasad, M.N.V.; Malec, P.; Waloszek, A.; Bojko, M.; Strzalka, K. Физиологические реакции *Lemna Trisulca L.* (Duckweed) на биоаккумуляцию кадмия и меди. *Plant Sci.* 2001, 161, S0168-S9452. [CrossRef].
62. Бурда К., Крук Й., Стржалка К., Шмид Г.Х. Стимуляция эволюции кислорода в фотосистеме II ионами меди(II). *Z. Fur Naturforsch. Sect. C J. Biosci.* 2002, 57, 853-857. [CrossRef].
63. Яныкин Д.В., Мальферари М., Рапино С., Вентуроли Г., Семенов А.Ю., Мамедов М.Д. Гидроксиэктон защищает обедненную Mn фотосистему II от фотоингибиции, действуя как источник электронов. *Photosynth. Res.* 2019, 141, 165-179. [CrossRef].
64. Давлетшина Л.Н., Семин Б.К. РН-зависимость фотоингибиции фотосистемы II: Связь со структурным переходом кислород-эволюционирующего комплекса при РН просвета тилакоида. *Photosynth. Res.* 2020, 145, 135-143. [CrossRef].
65. Oettmeier, W.; Masson, K. Пикрат как ингибитор фотосистемы II в фотосинтетическом транспорте электронов. *Eur. J. Biochem.* 1982,

122, 163-167. [[CrossRef](#)]

66. Мацуэ, Т.; Коике, С.; Учиды, И. Микроамперометрическая оценка ингибирования фотосинтеза в одном протопласте водоросли.

Биохим. Biophys. Res. Commun. **1993**, 197, 1283-1287. [[CrossRef](#)].

67. Тишер В., Штротманн Х. Связь между связыванием ингибиторов хлоропластами и ингибированием фотосинтетического транспорта электронов. *BBA Bioenerg.* **1977**, 460, 113-125. [[CrossRef](#)].
68. Ван Ренсен Ж.Ж.С., Вонг Д. Говинджи Характеристика ингибирования фотосинтетического транспорта электронов в хлоропластах гороха гербицидом 4,6-динитро-о-крезолом путем сравнительных исследований с 3-(3,4-дихлорфенил)-l,l-диметилмочевиной. *Z. Fur Naturforsch. Sect. C J. Biosci.* **1978**, 33, 413-420. [[CrossRef](#)].
69. Cedeno-Maldonado, A.; Swader, J.A.; Heath, R.L. Ион куприна как ингибитор фотосинтетического транспорта электронов в изолированных хлоропластах. *Физиол. растений.* **1972**, 50, 698-701. [[CrossRef](#)].
70. Требст, А. Ингибиторы в функциональном разрезе фотосинтетической электронно-транспортной системы. *Photosynth. Res.* **2007**, 92, 217-224. [[CrossRef](#)]
71. Робертс А.Г., Крамер Д.М. Ингибитор "двойной занятости" в кармане Q о комплекса хлоропластного цитохрома b 6 f. *Биохимия* **2001**, 40, 13407-13412. [[CrossRef](#)]
72. Таппер А., Мамедов Ф., Моквист Ф., Хаммарстрём Л., Стиринг С. Определение дальнего красного предела фотосистемы II в шпинате. *Plant Cell* **2009**, 21, 2391-2401. [[CrossRef](#)]
73. Vierke, G.; Struckmeier, P. Ингибирование миллисекундной люминесценции медью(II) в хлоропластах шпината. *Z. Für Naturforsch. C* **1978**, 33, 266-270. [[CrossRef](#)]
74. Каллис, П.Р. Феномены связывания и тушение флуоресценции. II: Фотофизика ароматических остатков и зависимость спектров флуоресценции от конформации белка. *J. Mol. Struct.* **2014**, 1077, 22-29. [[CrossRef](#)].
75. Yang, H.; Xiao, X.; Zhao, X.; Wu, Y. Intrinsic Fluorescence Spectra of Tryptophan, Tyrosine and Phenylalanine. In Proceedings of the 5th International Conference on Advanced Design and Manufacturing Engineering, Shenzhen, China, 19-20 September 2015; Atlantis Press: Париж, Франция, 2015.
76. Слива Е.И., ~~Смирнова~~ У., Базанув Б., Сичек М., Клак Я., ~~Смирнова~~ И. Синтез, структура и цитотоксические свойства Новые водорастворимые комплексы меди(II) на основе 2,9-диметил-1,10-фенантролина и их производных, содержащих 1,3,5-триаза-7-фосфаадамантан-7-оксид. *Molecules* **2020**, 25, 741. [[CrossRef](#)].
77. Фойер, К.Х.; Ноктор, Г. Стress-триггерная окислительно-восстановительная сигнализация: What's in PROSpect? *Растение. Cell Environ.* **2016**, 39, 951-964. [[CrossRef](#)].
78. Капарван А.Г., Сингх Н.Дж., Сатхе П.А. Электрохимическое исследование прямого и косвенного окисления 1,5-дифенилкарбазида в системах смешанных растворителей воды методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии. *Eurasian J. Anal. Chem.* **2011**, 6, 59-69.
79. Рост, Дж.; Рапопорт, С. Восстановительный потенциал глутатиона. *Nature* **1964**, 201, 185. [[CrossRef](#)].
80. Петрулеас В., Динер Б.А. Индуцированное светом окисление акцепторной стороны Fe(II) фотосистемы II экзогенными хинонами, действующими через сайт связывания QB. I. Хиноны, кинетика и PH-зависимость. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1987**, 893, 126-137. [[CrossRef](#)]
81. Маккорник А.Дж.; Бомбелли П.; Лиа-Смит Д.Дж.; Брэдли Р.В.; Скотт А.М.; Фишер А.К.; Смит А.Г.; Хай К.Дж. Производство водорода путем кислородного фотосинтеза с использованием цианобактерии *Synechocystis* Sp. PCC 6803 в системе био-фотоэлектролиза Cell (BPE). *Energy Environ. Sci.* **2013**, 6, 2682. [[CrossRef](#)].
82. Бадарау, А.; Деннисон, К. Термодинамика распределения меди и цинка в цианобактерии *Synechocystis* PCC 6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 13007-13012. [[CrossRef](#)]
83. Коуп Дж.Д.; Валле Х.У.; Холл Р.С.; Райли К.М.; Гоэл Э.; Бисвас С.; Хендрих М.П.; Випф Д.О.; Стокс С.Л.; Эмерсон Дж.П. Настройка редокс-потенциала меди(II)/меди(I) для более надежных реакций образования связи C-N, катализируемых медью. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2020**, 2020, 1278-1285. [[CrossRef](#)].
84. Jo, M.-J.; Shin, S.; Choi, M. Внутриэлектронный перенос амицианина с нового активного сайта на медный сайт типа 1 , настроенный на редокс-потенциал. *Appl. Biol. Chem.* **2018**, 61, 181-187. [[CrossRef](#)].
85. Яныкин Д.В., Хоробрых А.А., Хоробрых С.А., Климов В.В. Фотопотребление молекулярного кислорода на донорной и акцепторной сторонах фотосистемы II в обедненных Mn фрагментах субхлоропластной мембранны. *Биохим. Biophys. Acta Bioenerg.* **2010**, 1797, 516-523. [[CrossRef](#)].
86. Бринкер К., Ле Формаль Ф., Ли Х., Дюррант Ж., Уильям Резерфорд А., Фантуцци А. Фототоки фотосистемы II в гибридной системе металл оксид: Пути переноса электронов. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2016**, 1847, 379-389. [[CrossRef](#)].
87. Ареллано Х.Б., Лазаро Х.Х., Лопес-Горхе Х., Барон М. Донорная сторона фотосистемы II как место связывания меди с ингибиторами. *Photosynth. Res.* **1995**, 45, 127-134. [[CrossRef](#)]
88. Yruela, I.; Alfonso, M.; Baron, M.; Picorel, R. Влияние меди на белковый состав фотосистемы II. *Физиол. Plant.* **2000**, 110, 551-557. [[CrossRef](#)]
89. Бурда К., Крук Й., Стжалка К., Станек Й., Шмид Г., Крузе О. Мессбауэровские исследования взаимодействия ионов Cu(II) с негемовым железом и цитохромом b 559 в мутанте *Chlamydomonas Reinhardtii* PSI Minus. *Acta Phys. Pol. A* **2006**, 109, 237-247. [[CrossRef](#)].
90. Ренгер, Г. Действие 2-анилинотиофенов как ускорителей реакций дезактивации в водорасщепляющей ферментной системе фотосинтеза. *BBA Bioenerg.* **1972**, 256, 428-439. [[CrossRef](#)].
91. Климов В.В., Шувалов В.А., Хебер У. Фоторедукция феофитина как результат донорства электронов от системы расщепления воды к реакционным центрам фотосистемы-II. *Biochim. Биофиз. Acta Bioenerg.* **1985**, 809, 345-350. [[CrossRef](#)].
92. Карпантье Р., Фюрст Э.П., Накатани Х.Я., Арнцен К.Дж. Второй сайт для действия гербицидов в фотосистеме II.

Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. **1985**, *808*, 293-299. [[CrossRef](#)].

93. Климов В.В., Аллахвердиев С.И., Ладыгин В.Г. Фоторедукция феофитина в фотосистеме II целых клеток зеленых водорослей и цианобактерий. *Photosynth. Res.* **1986**, *10*, 355-363. [[CrossRef](#)].

94. Hsu, B.-D.; Lee, J.-Y.; Pan, R.-L. Два места связывания для DCMU в фотосистеме II. *Биохим. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *141*, 682-688. [[CrossRef](#)].
95. Аллахвердиев С.И., Жармухамедов С.К., Клинов В.В., Васильев С.С., Коратовский Б.Н., Пашенко В.З. Влияние диносеба и других фенольных соединений на кинетику затухания флуоресценции фотосистемы II хлорофилла у высших растений. *Бiol. Membr.* **1989**, *6*, 1147-1153.
96. Робертс А.Г., Грегор В., Бритт Р.Д., Крамер Д.М. Акцепторное и донорское взаимодействие фенольных ингибиторов в фотосистеме II. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2003**, *1604*, 23-32. [[CrossRef](#)]
97. Belatik, A.; Joly, D.; Hotchandani, S.; Carpentier, R. Re-Evaluation of Side Effects of Cytochrome B6f Inhibitor Dibromothymo-quinone on Photosystem II Excitation and Electron Transfer. *Photosynth. Res.* **2013**, *117*, 489-496. [[CrossRef](#)].
98. Hasni, I.; Yaakoubi, H.; Hamdani, S.; Tajmir-Riahi, H.-A.; Carpentier, R. Механизм взаимодействия Al³⁺ с белковым составом фотосистемы II. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0120876. [[CrossRef](#)].
99. Хо, Ф.М. Раскрытие каналов в фотосистеме II с помощью компьютерного моделирования: Текущий прогресс, будущие перспективы и уроки аналогичных систем. *Photosynth. Res.* **2008**, *98*, 503-522. [[CrossRef](#)].
100. Kulik, N.; Kutý, M.; R'eha, D. Исследование конформационных изменений в фотосистеме II во время разделения заряда. *J. Mol. Model.* **2020**, *26*, 75. [[CrossRef](#)].
101. Мойзэ Н., Мойя И. Корреляция между неоднородностью времени жизни и неоднородностью кинетики при индукции флуоресценции хлорофилла в листьях. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2004**, *1657*, 33-46. [[CrossRef](#)].
102. Шанскер Г., Тот С.З., Хольцварт А.Р., Гараб Г. Флуоресценция хлорофилла а: За пределами пределов модели QA. *Photosynth. Res.* **2014**, *120*, 43-58. [[CrossRef](#)].
103. Sipka, G.; Magyar, M.; Mezzetti, A.; Akhtar, P.; Zhu, Q.; Xiao, Y.; Han, G.; Santabarbara, S.; Shen, J.-R.; Lambrev, P.H.; et al. Light-Adapted Charge-Separated State of Photosystem II: Structural and Functional Dynamics of the Closed Reaction Center. *Plant Cell* **2021**, *33*, 1286-1302. [[CrossRef](#)].
104. Сирохивал А., Нис Ф., Пантазис Д.А. Белковый матричный контроль возбуждения реакционного центра в фотосистеме II. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 18174-18190. [[CrossRef](#)].
105. Вёри А.Б., Катона Г., Йоханссон Л.К., Фриц Э., Мальмерберг Э., Андерссон М., Винсент Ж., Эклунд М., Каммарата М., Вульф М. и др. Светоиндцированные структурные изменения в фотосинтетическом реакционном центре, уловленные с помощью дифракции Лауэ. *Science* **2010**, *328*, 630-633. [[CrossRef](#)].
106. Рахими Й., Гулдинг А., Шрестха С., Мирпури С., Део С.К. Механизм индуцированного медью тушения флуоресценции красного флуоресцентного белка DsRed. *Биохим. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *370*, 57-61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].