

УДК 577.3

ЭЛЕКТРОННЫЙ ПАРАМАГНИТНЫЙ РЕЗОНАНС: ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ СВЕТОВЫХ СТАДИЙ ФОТОСИНТЕЗА РАСТЕНИЙ

© 2022 г. Э.К. Рууге*, **, А.Н. Тихонов*, ***

*Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/2

**Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а
E-mail: ruuge@mail.ru

***Институт биохимической физики имени Н.М.Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4
E-mail: an_tikhonov@mail.ru

Поступила в редакцию 20.02.2022 г.

После доработки 20.02.2022 г.

Принята к публикации 09.03.2022 г.

Метод ЭПР находит широкое применение в биофизике фотосинтеза, поскольку он служит эффективным инструментом для изучения процессов электронного и протонного транспорта в различных фотосинтетических системах. Работа посвящена исследованию регуляции электронного транспорта в хлоропластах методом ЭПР, выполненному при непосредственном участии авторов. Показаны возможности использования метода ЭПР для изучения кинетики переноса электронов в хлоропластах высших растений *in situ* (листья высших растений) при комнатных температурах и рассмотрены спектры ЭПР хлоропластов при криогенных температурах. Последнее имеет особое значение для обоснования используемого нами «кинетического» метода измерения рН внутри тилакоидов.

Ключевые слова: электронный парамагнитный резонанс, фотосинтез, электронный транспорт.

DOI: 10.31857/S0006302922030097, EDN: ANNGVU

У высших растений процессы оксигенного фотосинтеза протекают в хлоропластах – специализированных энергопреобразующих органеллах растительной клетки [1]. Схематическое изображение хлоропласта показано на рис. 1а. Под двойной оболочкой хлоропласта, состоящей из наружной и внутренней мембран, находятся протяженные мембранные структуры, которые образуют замкнутые везикулы, имеющие форму дисков и называемые тилакоидами. Мембраны тилакоидов содержат фотосинтетические пигмент-белковые комплексы (рис. 1б). У высших растений тилакоиды группируются в граны – стопки сплюснутых и тесно прижатых друг к другу тилакоидов. Продолжением отдельных тилакоидов гран служат выступающие из них межгранные (стромальные) тилакоиды. В строме (пространство между оболочкой хлоропласта и тилакоидами) содержатся молекулы РНК, ДНК, рибосомы, крахмальные зерна, а также многочисленные

ферменты, которые обеспечивают усвоение CO_2 растениями. Тилакоидные мембраны содержат пигмент-белковые комплексы, участвующие в фотосинтетическом транспорте электронов, а также АТФ-синтазные комплексы, катализирующие образование АТФ из АДФ и неорганического фосфата (Φ_{H}).

Биофизические методы исследования сыграли решающую роль в выяснении механизмов транспорта электронов у растений. Методами абсорбционной спектроскопии высокого временного разрешения были идентифицированы и охарактеризованы переносчики электрон-транспортной цепи хлоропластов; флуоресцентный анализ пигментов фотосинтетического аппарата лежит в основе диагностики функционального состояния хлоропластов *in vivo*. Особую роль в изучении оксигенного фотосинтеза сыграл метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), с помощью которого в хлоропластах были идентифицированы электронные переносчики, практически невидимые традиционными оптическими

Сокращения: ЭПР – электронный парамагнитный резонанс, ФС I – фотосистема I, ФС II – фотосистема II.

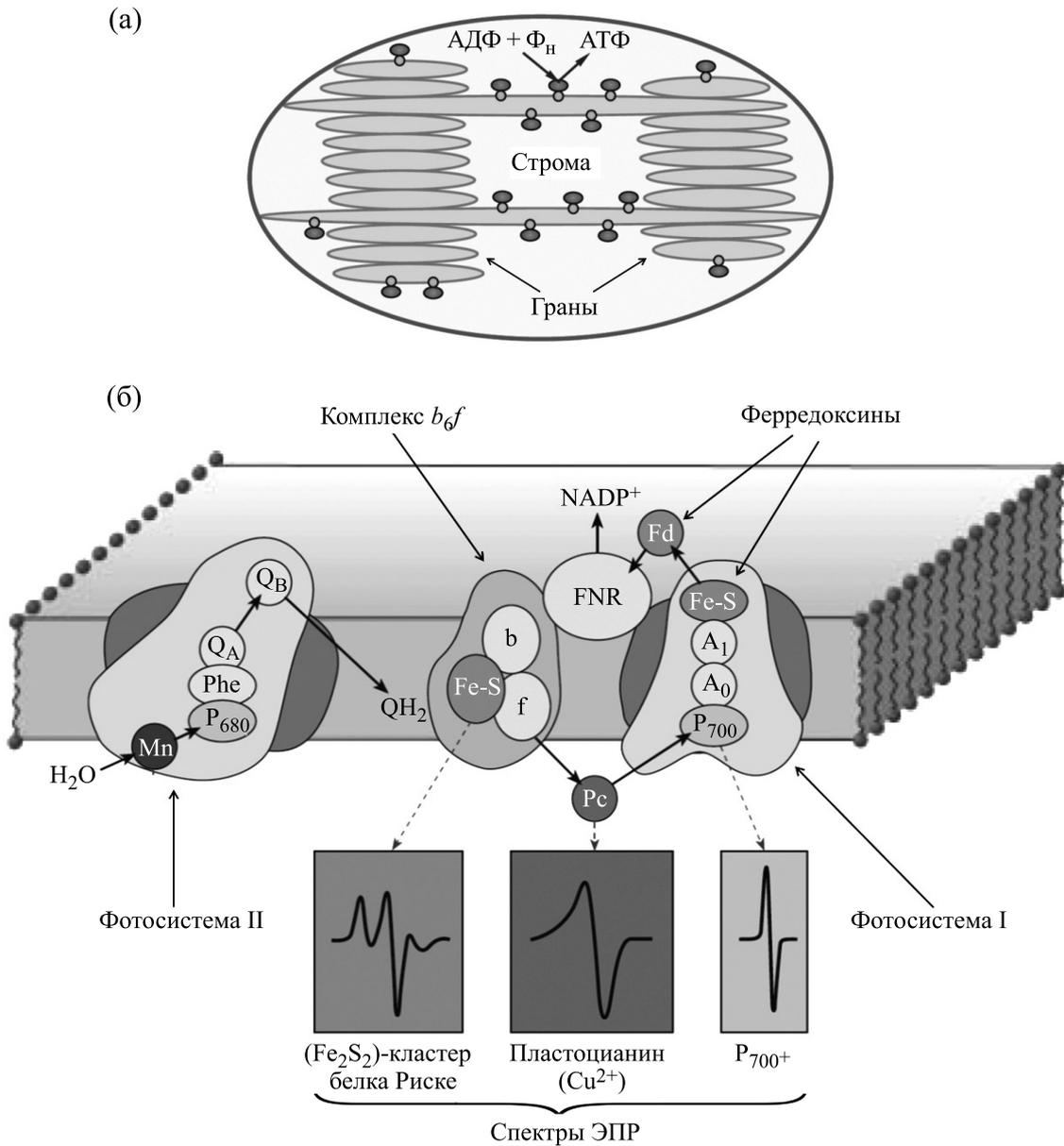


Рис. 1. Схематические изображения тилакоидной системы хлоропласта (а) и фотосинтетической цепи переноса электронов (б).

методами, поскольку сравнительно слабые спектры поглощения этих молекул замаскированы интенсивными спектрами поглощения фотосинтетических пигментов и цитохромов. К таким переносчикам относятся кофакторы электронного транспорта, содержащие негемовое железо – белки, входящие в пигмент-белковый комплекс фотосистемы I (ФС I) [2], медь-содержащий белок пластоцианин [3] и железо-серный кластер (Fe_2S_2) белка Риске [4], входящего в цитохромный b_6f -комплекс хлоропластов [5–8].

Л.А.Блюменфельду принадлежит приоритет в изучении биологических систем методом ЭПР.

Он был одним из первых в мире, кто начал такие исследования в конце 50-х годов XX века (см. очерк С.Э. Шноля в книге [9]). В научном наследии Л.А. Блюменфельда значительная часть исследований посвящена изучению фотосинтетических систем методом ЭПР [10–20]. Эти работы проводились в течение многих лет на кафедре биофизики физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и в Институте химической физики Академии наук. Охватить в краткой статье все многообразие исследований в области биофизики фотосинтеза, выполненных под руководством Л.А. Блюменфельда, не представляется

возможным. Отметим лишь некоторые из наиболее важных научных достижений в этой области. Методом ЭПР была детально изучена кинетика фотоиндуцированных превращений P_{700} в хлоропластах высших растений *in situ* (листья) и выявлены два участка регуляции фотосинтетического переноса электронов – акцепторный участок ФС I и стадия окисления пластохинола (PQH_2) цитохромным b_6f -комплексом [21–24]. В работе Блюменфельда с сотрудниками Института химической физики [20] было показано функционирование двух-электронного «затвора», связанного с двух-электронным восстановлением пластохинона (PQ) на акцепторном участке фотосистемы 2 (ФС II) до его полностью восстановленной формы – пластохинола (PQH_2). Пластохинол окисляется цитохромным b_6f -комплексом, содержащим железо-серный кластер Fe_2S_2 белка Риске. Анализируя релаксационные характеристики Fe_2S_2 центров в цепях электронного транспорта митохондрий и хлоропластов, Блюменфельд предположил, что в белках Риске цитохромных комплексов bc_1 и b_6f происходят сравнительно медленные конформационные перестройки белковой глобулы. Согласно релаксационной концепции ферментативного катализа, выдвинутой Блюменфельдом [11–14], эти перестройки инициируются быстрыми реакциями переноса электронов в электрон-транспортных цепях митохондрий и хлоропластов. Впоследствии предположение о конформационных изменениях белка Риске нашло убедительное экспериментальное доказательство [25] (см. также обзорные статьи [5–8]).

Л.А. Блюменфельд с большим интересом отнесся к работам в области биофизики фотосинтеза, которые велись на кафедре биофизики физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. В краткой статье нет возможности рассказать обо всех направлениях этих исследований. Мы остановимся на работах, посвященных изучению регуляции электронного транспорта в хлоропластах методом ЭПР, которые были выполнены под руководством и при непосредственном участии авторов данной статьи. Мы проиллюстрируем возможности использования метода ЭПР для изучения кинетики переноса электронов в хлоропластах высших растений *in situ* (листья высших растений) при комнатных температурах и рассмотрим спектры ЭПР хлоропластов при криогенных температурах. Последнее имеет особое значение для обоснования используемого нами «кинетического» метода измерения pH внутри тилакоидов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили листья комнатного растения китайской розы (*Hibiscus rosa-sinensis*), листья бобов (*Vicia faba*) и изолированные из них хлоропласты. Методика выделения хлоропластов класса Б из проростков бобов сорта «Русские черные» описана в работах [18, 26]. Хлоропласты суспендировали в среде инкубации, содержащей 10 мМ буфер трицин (pH 7.5). В качестве искусственного акцептора электронов в ФС I использовали 10 мкМ раствор метилвиологена. Спектры ЭПР, измеряемые при комнатной температуре (22–24°C), регистрировали при СВЧ-мощности 10 мВт и амплитуде ВЧ-модуляции, равной 0.4 мГл. Для регистрации кинетики окислительно-восстановительных превращений фотореакционного центра фотосистемы I (P_{700}) магнитное поле фиксировали на низкополюсовом экстремуме сигнала ЭПР от окисленных центров P_{700}^+ . Образцы освещали белым светом от лампы накаливания (300 Вт), возбуждающим обе фотосистемы, или дальним красным светом ($\lambda_{\text{макс}} = 707$ нм, 8 Вт), выделяемым с помощью интерференционного фильтра IF707 (Karl Zeiss Jena, Германия) и возбуждающим преимущественно ФС I.

Измерения спектров ЭПР исследуемых объектов проводили с помощью ЭПР-спектрометров E-4 и E-9E (Varian, США), укомплектованных приставками для варьирования температуры образцов в широком диапазоне. Измерения спектров ЭПР при криогенных температурах проводили с использованием установки ESR-9 (Oxford Instruments, Великобритания). Препараты выделенных хлоропластов помещали в кварцевые ампулы и затем адаптировали к темноте или освещали белым светом в течение 1 мин. Затем ампулы с образцами быстро замораживали путем охлаждения их в жидком бутане до 77 К и помещали в резонатор спектрометра E-109E. Температуру измеряемых образцов варьировали в интервале 6–30 К, СВЧ-мощность – в интервале 0.01–10 мВт. Температуру образцов в резонаторе спектрометра измеряли с помощью калиброванной термодпары. Особое внимание было уделено тщательному выбору кварцевых ампул, которые не давали паразитных сигналов ЭПР при криогенных температурах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетика фотоиндуцированных редокс-превращений P_{700} в хлоропластах. На рис. 2 показаны спектры ЭПР хлоропластов бобов и кинетики фотоиндуцированных изменений величины сигнала ЭПР от окисленных центров P_{700}^+ в листьях и в изолированных хлоропластах бобов. Из

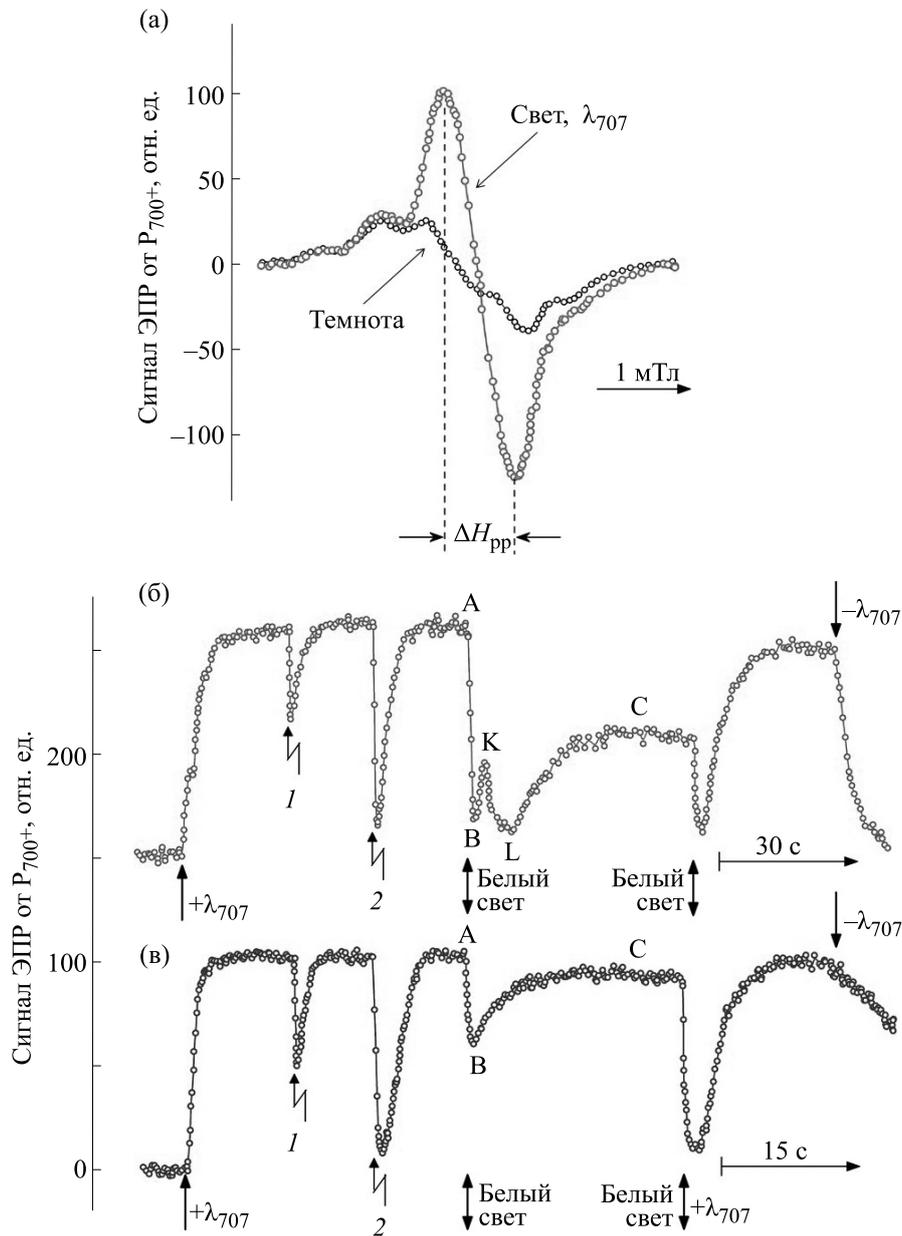


Рис. 2. Спектры ЭПР хлоропластов бобов ((а), первая производная спектра поглощения) и кинетики фотоиндуцированных изменений величины сигнала ЭПР от P_{700}^+ в листьях (б) и изолированных хлоропластах бобов (в). Зигзагообразными стрелками показаны моменты подачи всплеск белого света длительностью $t_{1/2} = 7$ мкс (1) или $t_{1/2} = 750$ мкс (2).

рис. 2а видно, что освещение хлоропластов дальним красным светом ($\lambda_{\text{макс}} = 707$ нм) вызывает окисление P_{700} . Об этом однозначно свидетельствуют параметры сигнала ЭПР, индуцированного дальним красным светом (значение g -фактора, равного 2.0025, и полуширина сигнала $\Delta H_{pp} = 0.9$ мТл) [27]. В ответ на всплески белого света различной длительности, подаваемые на фоне дальнего красного света, происходит сначала восстановление P_{700}^+ , вслед за которым наблюдается ре-окисление P_{700} за счет действия света с $\lambda_{\text{макс}} = 707$ нм.

После включения непрерывного белого света происходили немонотонные фотоиндуцированные изменения сигнала ЭПР от P_{700}^+ . В листьях бобов (рис. 2б) мы наблюдали многофазную кинетику, включающую несколько стадий изменений величины сигнала (кривая А–В–К–Л–С). В случае изолированных хлоропластов класса Б наблюдалась более простая кинетическая кривая (так называемый «перехлест» А–В–С, рис. 2в).

Нами была изучена зависимость кинетики окислительно-восстановительных превращений

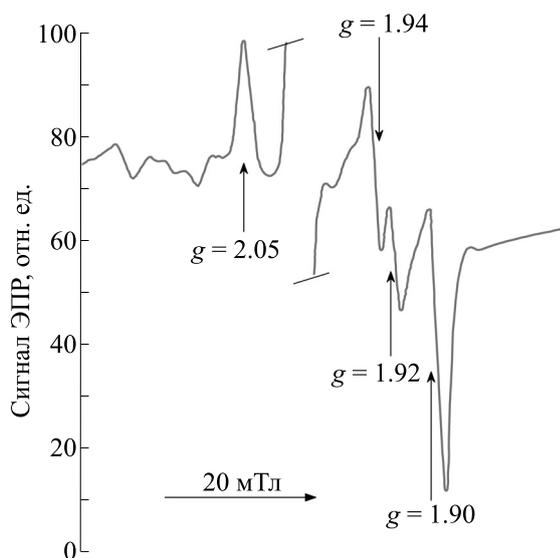


Рис. 3. Спектр ЭПР хлоропластов бобов, замороженных на свету в присутствии 20 мМ дитионита натрия. Температура образца при регистрации спектров равна 20 К.

P_{700} от предыстории освещения образцов (длительность адаптации к темноте или к свету определенного спектрального состава) и от действия ингибиторов или медиаторов электронного транспорта, а также разобщителей, подавляющих трансмембранную разность электрохимических потенциалов в хлоропластах (см. подробнее работы [22–24, 28–32]). На основании этого было выяснено, какие факторы регуляции электронного транспорта определяют немонотонную кинетику изменений сигнала ЭПР от P_{700}^+ в хлоропластах листьев, адаптированных к темноте. Установлено, что основной вклад в наблюдаемые явления вносят: 1) фотоиндуцированное увеличение активности ферментов цикла Кальвина-Бенсона, вызывающее ускорение оттока электронов от ФС I; 2) уменьшение скорости притока электронов к P_{700}^+ [18, 23, 24, 32]. Ослабление потока электронов от ФС II к ФС I может происходить по разным причинам, включая уменьшение фотохимической активности ФС II вследствие усиления нефотохимического тушения возбуждения хлорофилла в светособирающей антенне ФС II и замедления скорости окисления пластохинола (PQH_2) цитохромным *b₆f*-комплексом в результате фотоиндуцированного закисления внутритилакоидного пространства (pH_{in}) [33–37].

Последнее представляет особый интерес, поскольку на этом явлении основан «кинетический» метод неинвазивного измерения pH_{in} в хлоропластах *in situ* и *in vitro*. Суть метода заключается в измерении скорости переноса электро-

нов к P_{700}^+ , зависящей от pH_{in} [18, 29, 34]. «Кинетический» метод измерения pH_{in} был использован в наших работах для измерения транстилакоидной разности pH (ΔpH) в различных метаболических состояниях хлоропластов (см. подробнее обзор [37]). Одно из условий для адекватного использования этого метода заключается в том, что состояние электронных переносчиков как в сопряженных, так и в разобщенных хлоропластах, используемых для построения калибровочной зависимости скорости переноса электронов между ФС II и ФС I от pH_{in} , должно быть одинаковым. Для обоснования этого метода положения нами были проведены описанные ниже измерения низкотемпературных спектров ЭПР хлоропластов.

Окислительно-восстановительное состояние переносчиков электрон-транспортной цепи (по данным низкотемпературной ЭПР-спектроскопии). На рис. 3 представлены спектры ЭПР хлоропластов бобов, восстановленных дитионитом и замороженных непосредственно во время их освещения белым светом. В спектре ЭПР видны интенсивные линии, принадлежащие восстановленным акцепторам ФС I – железо-серным центрам F_A и F_B . Сопоставление *g*-факторов этих сигналов с литературными данными свидетельствует о том, что в наблюдаемый спектр могут вносить вклад как взаимодействующие, так и не взаимодействующие друг с другом центры F_A и F_B (сигналы с $g = 1.94$ и $g = 1.92$) (об идентификации линий ЭПР в хлоропластах при криогенных температурах см. обзорные работы [38–40]). Как и следовало ожидать, в спектре ЭПР отсутствует сигнал, который мог бы принадлежать к фракции водорастворимого феррредоксина, вымываемого при выделении хлоропластов класса Б. Наиболее интенсивная линия сигнала с $g_y = 1.89–1.90$ близка к полосе с $g_x = 1.89$, принадлежащей акцептору F_B и/или F_A (при условии, что он взаимодействует с восстановленным акцептором F_B).

Для однозначного отнесения сигнала с $g_y = 1.90$ к восстановленному Fe_2S_2 кластеру белка Рискен нам необходимо было доказать, что он отличается по своим характеристикам от компоненты сигнала с $g_x = 1.89$, принадлежащего восстановленному центру F_B . Мы смогли убедиться в этом, измеряя зависимость интенсивностей линий с различными значениями *g*-тензора в зависимости от СВЧ-мощности и температуры образца (данные не приведены).

В верхней части рис. 4 показаны спектры ЭПР в хлоропластах, замороженных в темноте после предварительного освещения хлоропластов белым светом в присутствии грамицидина D. Четко видны сигналы, принадлежащие окисленному

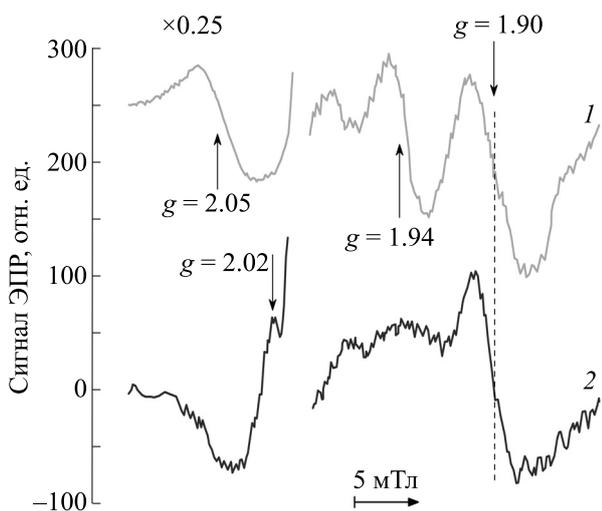


Рис. 4. Спектры ЭПР хлоропластов бобов, измеренные при 17 К: спектр 1 – хлоропласты замороженные в темноте после предварительного освещения белым светом в течение 30 с; спектр 2 – хлоропласты, адаптированные в течение 40 мин к темноте в присутствии 10 мМ аскорбата натрия.

пластоцианину ($g = 2.05$), восстановленному Fe-S центру F_A ($g = 1.94$) и восстановленному центру Риске ($g = 1.90$). Принадлежность сигнала с $g = 1.90$ центру Риске доказывается тем, что этот

сигнал наблюдается в хлоропластах, инкубированных в темноте в присутствии 10 мМ аскорбата. В этом случае линии сигнала ЭПР с $g = 1.94$ и $g = 1.92$, относящиеся к восстановленным центрам F_A и F_B , отсутствовали. Вместе с тем наряду с линией при $g = 1.90$ наблюдалась компонента с $g = 2.02$, относящаяся к низкополевой компоненте сигнала ЭПР от восстановленного железо-серного кластера белка Риске.

На рис. 5 показаны фрагменты спектров ЭПР образцов хлоропластов для компонент сигнала с $g = 2.05$ (окисленный пластоцианин) и с $g = 1.90$ (восстановленный Fe_2S_2 центр белка Риске). Образцы были получены путем быстрого замораживания хлоропластов в разных метаболических состояниях на свету или в темноте (через 30 с после выключения света). Из этих данных видно, что во время освещения хлоропластов непрерывным белым светом большая часть молекул пластоцианина и Fe_2S_2 центра Риске находятся в окисленном состоянии. После выключения света эти переносчики восстанавливаются за счет пластохинонового пула, который поддерживается, по крайней мере частично, в восстановленном состоянии. О состоянии пластохинонового пула в условиях освещения мы можем судить по кинетике окислительно-восстановительных превращений P_{700} , показанной на рис. 2в. Быстрое восста-

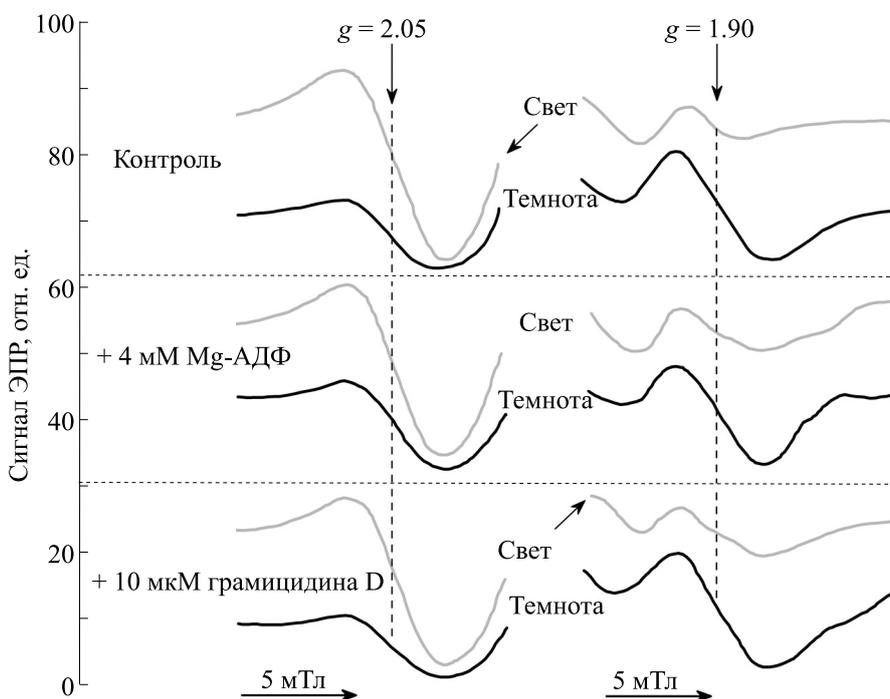


Рис. 5. Спектры ЭПР хлоропластов бобов, измеренные при 20 К. Образцы были получены путем быстрого замораживания суспензий хлоропластов, находившихся в разных метаболических состояниях при освещении и в темноте (после выключения света). Контроль – хлоропласты без добавок; хлоропласты в условиях синтеза АТФ (в присутствии 10 мМ Mg-ADP); разобшенные хлоропласты (в присутствии 10 мкМ грамицидина D).

новление P_{700}^+ сразу после выключения белого света свидетельствует о том, что в цепи электронного транспорта между ФС II и ФС I имеются восстановленные молекулы пластохинола.

Приведенные на рис. 5 данные свидетельствуют о том, что во все трех метаболических состояниях – в контроле (без добавок), в условиях фотофосфорилирования (в присутствии 4 мМ Mg-АТФ) и в разобренных хлоропластах (при добавлении 10 мкМ грамицидина D), состояние донорного участка цепи переноса электронов между цитохромным b_6f -комплексом и P_{700} было практически одинаковым. На основании этого мы можем утверждать, что одно из основных требований, необходимых для корректного измерения внутритилакоидного рН (pH_{in}) «кинетическим» методом, в наших опытах выполняется. Различие в скоростях восстановления P_{700}^+ , наблюдавшееся нами в разных метаболических состояниях хлоропластов [18, 29], обусловлено разными значениями внутритилакоидного pH_{in} , а не разными состояниями электрон-транспортной цепи на участке между цитохромным b_6f -комплексом и P_{700} . Отметим, что развитый нами «кинетический» метод измерения pH_{in} имеет одно неоспоримое преимущество – с его помощью можно проводить неинвазивные (*in situ*) измерения pH_{in} в хлоропластах, находящихся в листьях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Отметим, что метод ЭПР нашел широкое применение в биофизике фотосинтеза, поскольку он служит эффективным инструментом для изучения процессов электронного и протонного транспорта в различных фотосинтетических системах. Выше мы рассмотрели лишь некоторые направления в исследованиях биоэнергетических процессов в фотосинтезирующих системах путем регистрации электрон-транспортных процессов в хлоропластах и листьях высших растений методом ЭПР. Другие возможности использования метода ЭПР в изучении фотосинтеза связаны с использованием стабильных радикалов (спиновых меток). С помощью стабильных радикалов, служащих парамагнитными зондами, чувствительными к их локальному окружению, можно следить за структурными перестройками в пигмент-белковых комплексах, а также измерять *транс*-тилакоидную разность электрохимических потенциалов ионов водорода [37, 41].

БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работа посвящена 100-летию со дня рождения нашего учителя, Льва Александровича

Блюменфельда, одного из пионеров применения ЭПР в изучении биологических систем.

Мы благодарны нашим коллегам, Г.Б. Хомутову, А.А. Тимошину и С.Б. Рыжикову, совместно с которыми была выполнена часть тех наших ранних работ по исследованию механизмов регуляции электронного транспорта в хлоропластах высших растений, на которые мы ссылаемся в данной работе. Мы также признательны Ю.А. Кокшарову и Б.В. Трубицину за компьютеризацию спектрометров ЭПР моделей Е-4 и Е-109Е, использованных в нашей работе. Наша особая благодарность Б.В. Трубицину за помощь в оцифровке спектров ЭПР.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20047).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дж. Эдвардс и Д. Уокер, *Фотосинтез С3 и С4 растений: механизмы и регуляция* (Мир, М., 1986).
2. R. Malkin and A. J. Bearden, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **68**, 16 (1971).
3. R. Malkin and A. J. Bearden, Biochim. Biophys. Acta **292**, 169 (1973).
4. R. Malkin and P. J. Aparicio, Biochim. Biophys. Res. Commun. **63**, 1157 (1975).
5. W.A. Cramer and S. S. Hasan, Adv. Photosynth. Respiration **41**, pp.177–207 (2016).
6. A. N. Tikhonov, In *Membrane protein complexes: structure and function, sub-cellular biochemistry*, Ed. by J. R. Harris and E. J. Boekema (Springer, Singapore, 2018), Vol. 87, pp. 287–328.
7. L. A. Malone, M. S. Proctor, A. Hitchcock, et al., Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics, **1862**, 148380 (2021).
8. M. Sarewicz, S. Pintscher, R. Pietras, et al., Chem. Rev. **121**, 2020 (2021).
9. С. Э. Шноль, *Герои, злодеи, конформисты отечественной науки*, изд. 6, испр. (URSS, М., 2022).
10. Л. А. Блюменфельд, Изв. АН СССР. Сер. биол., № 3, 285 (1957).
11. Л. А. Блюменфельд, *Проблемы биологической физики* (Москва: Наука, 1974).

12. L. A. Blumenfeld, *Physics of Bioenergetic Processes* (Springer-Verlag, Heidelberg, 1983).
13. L. A. Blumenfeld and A. N. Tikhonov, *Biophysical Thermodynamics of Intracellular Processes. Molecular Machines of the Living Cell* (Springer-Verlag, New-York, 1994).
14. L. A. Blumenfeld, R. M. Davydov, and A. N. Tikhonov, *J. Mol. Liquids* **42**, 231 (1989).
15. Э. К. Рууге, А. Н. Тихонов и Л. А. Блюменфельд, *Биофизика* **19**, 938 (1974).
16. Э. К. Рууге, А. Н. Тихонов и Л. А. Блюменфельд, *Биофизика* **19**, 1033 (1974).
17. А. Н. Тихонов, Э. К. Рууге, В. К. Субчински и др., *Физиол. растений* **22**, 5 (1975).
18. A. N. Tikhonov, G. V. Khomutov, E. K. Ruuge, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **637**, 321 (1981).
19. А. Н. Тихонов, А. А. Тимошин и Л. А. Блюменфельд, *Молекуляр. биология* **17**, 1236 (1983).
20. L. A. Blumenfeld, M. G. Goldfield, A. I. Tzapin, et al., *Photosynthetica* **8**, 168 (1974).
21. А. Н. Тихонов и Э. К. Рууге, *Биофизика* **20**, 1049 (1975).
22. Э. К. Рууге и А. Н. Тихонов, *Биофизика* **22**, 268 (1977).
23. С. Б. Рыжиков и А. Н. Тихонов, *Биофизика* **33**, 642 (1988).
24. A. N. Tikhonov, *Photosynthesis Research* **125**, 65 (2015).
25. Z. Zhang, L. Huang, V. M. Schulmeister, et al., *Nature* **392**, 677 (1998).
26. S. Izawa, R. Kraayehof, E. K. Ruuge, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **314** (3), 328 (1973).
27. A. N. Webber and W. Lubitz, *Biochim. Biophys. Acta* **1507**, 61 (2001).
28. А. Н. Тихонов и Э. К. Рууге, *Биофизика* **22**, 839 (1978).
29. A. N. Tikhonov, G. V. Khomutov, and E. K. Ruuge, *Photobiochem. Photobiophys.* **8**, 261 (1984).
30. А. Н. Тихонов., Г. Б. Хомутов и Э. К. Рууге, *Молекуляр. биология* **13**, 1085 (1979).
31. Г. Б. Хомутов, А. Н. Тихонов и Э. К. Рууге, *Молекуляр. биология* **15**, 182 (1981).
32. B. V. Trubitsin, A. V. Vershubskii, V. I. Priklonskii, et al., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **152**, 400 (2015).
33. B. Rumberg and U. Siggel, *Naturwissenschaften* **56**, 130 (1969).
34. A. N. Tikhonov, *Photosynth. Res.* **116**, 511 (2013).
35. D. M. Kramer, C. A. Sacksteder, and J. A. Cruz, *Photosynth. Res.* **60**, 151 (1999).
36. A. N. Tikhonov, R. V. Agafonov, L. A. Grigor'ev, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1777**, 285 (2008).
37. A. N. Tikhonov, *Cell Biochem. Biophys.* **75**, 421 (2017).
38. K. Brettel, *Biochim. Biophys. Acta* **1318**, 322 (1997).
39. J. H. Golbeck, *Photosynth. Res.* **61**, 107 (1999).
40. I. R. Vassiliev, M. L. Antonkine, and J. H. Golbeck, *Biochim. Biophys. Acta* **1507**, 139 (2001).
41. A. N. Tikhonov and W. K. Subczynski, In *Biomedical EPR – Part A: Free radicals, metals, medicine, and physiology*, Ed. by S. S. Eaton, G. R. Eaton, and L. J. Berliner (Kluwer Academic/Plenum Publishers, Boston, MA, 2005), Vol. 23, pp. 147–194.

Electron Paramagnetic Resonance: Study of the Regulatory Mechanisms of Light Phases of Photosynthesis in Plants

E.K. Ruuge*, ** and A.N. Tikhonov*, ***

*Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia

**Chazov National Medical Research Centre for Cardiology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 3-ya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia

***Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

Electron paramagnetic resonance (EPR) is a method widely used in biophysics of photosynthesis, since it serves as an effective tool for studying the processes of electron and proton transport in different photosynthetic systems. The aim of this study was to investigate the regulation of electron transport in chloroplasts using the EPR method, carried out by researchers who prepared this research paper. This paper provides information regarding the use of the EPR method for studying the kinetics of electron transfer in chloroplasts of higher plants *in situ* (leaves of higher plants) at room temperatures and considers the EPR spectra of chloroplasts at cryogenic temperatures. The latter holds particular significance for substantiation of the "kinetic" method we use for measuring pH inside the thylakoids.

Keywords: electron paramagnetic resonance, photosynthesis, electron transport