

УДК 581.1

ХИМИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ ФОТОСИСТЕМЫ II

© 2021 г. С. К. Жармухамедов^а, С. И. Аллахвердиев^{б, *}

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук, Пущино, Россия

^бФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: suleyman.allakhverdiev@gmail.com

Поступила в редакцию 11.08.2020 г.

После доработки 11.08.2020 г.

Принята к публикации 11.08.2020 г.

Несмотря на регулярное появление новых все более точных и более эффективных методов научных исследований, ингибиторный анализ по-прежнему все еще занимает далеко не последнее место среди широко используемых экспериментальных подходов. Химические ингибиторы фотосистемы II также используются в качестве инструмента научного познания во многих современных исследованиях. Разрабатываются и/или выявляются новые химические ингибиторы, открываются новые и/или существенно корректируются уже исследованные эффекты известных ингибиторов. В обзоре представлена обобщенная информация как об известных (диурон (3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина), диносеб (2,4-динитро-6-втор-бутилфенол), ADRY-агенты (агенты, вызывающие ускорение реакций дезактивации системы окисления воды (Acceleration of the Deactivation Reactions of the water-splitting enzyme system Y)), так и о недавно выявленных химических ингибиторах ФС II (производные перфторизопропилдинитробензола, металлоорганические комплексы), а также о действии ингибиторов карбоангидраз на фотохимическую активность ФС II.

Ключевые слова: фотосистема II, химические ингибиторы, диурон, диносеб, производные перфторизопропилдинитробензола, металлоорганические комплексы, фотохимическая, карбоангидразная активность ФС II

DOI: 10.31857/S0015330321020226

ВВЕДЕНИЕ

Развитие науки сопровождается появлением новых данных во всех областях знаний. Знания о молекулярных механизмах действия известных и широко используемых в экспериментальных исследованиях химических агентов постоянно дополняются новой информацией, выявляются неизвестные ранее эффекты, уточняются концентрационные зависимости уже исследованных явлений. Это касается и химических ингибиторов фотосинтеза. В соответствии со свойствами и эффектами на фотохимическую активность фотосистемы II химические ингибиторы подразделяют на две большие группы, производные мочевины и триазина (диурон, атразин) и ингибиторы фенольного типа (диносеб). Основные эффекты диурона исследованы, и этот агент широко используется во множестве научных работ в качестве “тонкого инструмента” исследований. В то же

время появляется много сообщений о неизвестных ранее эффектах диурона, диносеба, дибромтимохинона (ДВМІВ) и других ингибиторов. Кроме блокирования переноса электрона на акцепторной стороне ФС II описаны эффекты диурона и на донорной стороне этой фотосистемы [1, 2]. Показано, что обратимое фотовосстановление феофитина (Pheo) в кислород-выделяющих препаратах ФС II ингибируется диуроном и реактивируется последующим добавлением экзогенного донора электрона, аскорбата [3, 4], что может свидетельствовать о способности диурона ингибировать активность донорной стороны ФС II. Показано, что диносеб способен к окислительно-восстановительному взаимодействию с компонентами реакционного центра (РЦ) ФС II [5, 6]. Показано, что ДВМІВ значительно тушит возбужденные состояния хлорофилла антенны ФС II даже при низкой концентрации [7]. Доминирование тех или иных эффектов (на донорной или акцепторной стороне ФС II) зависит не только от концентрации ингибирующего агента, но и от концентрации биологического образца [8]. Несомненно, исследователям, использующим в своих

Сокращения: КА – карбоангидраза, КАА – карбоангидразная активность, КВК – кислород-выделяющий комплекс, ПФИПДНБ – перфторизопропилдинитробензол, РЦ – реакционный центр, ТЛ – термолюминесценция, ФСА – фотосинтетическая активность, НА – гидроксилламин.

работах такие “химические инструменты”, необходимо в полной мере владеть этой информацией, чтобы иметь возможность избежать неправильного толкования получаемых результатов. Выявлена новая группа высокоэффективных ингибиторов переноса электрона в ФС II, производных перфторизопропилдинитробензола (ПФИПДНБ), действие которых основано на формировании короткого циклического переноса электрона с участием первичного донора и акцептора электрона феофитина и хлорофилла P_{680} соответственно (или, возможно, Y_Z) [9–11], показана их способность (в отличие от используемых ранее ингибиторов) проявлять ингибирующее действие на уровне изолированных комплексов D1/D2/цитохром b_{559} – комплексы реакционных центров (РЦ) [12], предохранять ФС II от фотоингибирования за счет образования указанного выше циклического переноса электрона вокруг ФС II с их участием [13], защищать от фотодеструкции в комплексах РЦ преимущественно белок D2 [14], причем местом их связывания в отличие от традиционных ингибиторов (диурина и атразина), очевидно, является не белок D1, а белок D2. Об этом свидетельствуют также результаты исследований места связывания производных ПФИПДНБ [15] и отсутствие конкуренции за место связывания между этими ингибиторами и диуроном [16]. Исследовано несколько больших групп новых металлоорганических комплексов способных одновременно эффективно подавлять как фотохимическую, так и карбоангидразную активность ФС II, а также активность нескольких ключевых ферментов растительной клетки [17–19]. Все эти новые результаты требуют тщательного и подробного рассмотрения. Не менее важно, особенно для начинающих экспериментаторов, иметь подробную информацию о самых разных возможных проявлениях действия известных ингибиторов при измерении широко используемых реакций, характеризующих активность ФС II. В современных публикациях в основном описаны главные, устоявшиеся, общепринятые представления о механизмах действия ингибиторов, причем достаточно кратко. Однако почти полностью отсутствует описание детального проявления их действия. Эта информация хорошо отражена в первоначальных работах, в публикациях 70–90-х гг., в которых эффекты ингибиторов не только подробно описаны, но и не менее подробно и обоснованно объяснены. Поэтому еще одной задачей обзора было рассмотрение работ тех лет.

ИНГИБИТОРЫ ДИУРОНОВОГО И ТРИАЗИНОВОГО ТИПА

Диурон и монурон как ингибиторы фотосинтетического транспорта электрона впервые были описаны в работе Весельса и Ван-Дер-Вина в

1956 году [20]. Позже было показано, что эти соединения не ингибируют фотовыделение водорода в ФС I, циклическое фотофосфорилирование, фотовосстановление НАДФ⁺ от восстановленного 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ). На основании гипотезы, что флуоресценция (F) хлорофилла ФС II тушится окисленной формой первичного акцептора электрона Q_A , и того факта, что диурон вызывает значительное увеличение выхода F (подобно воздействиям, приводящим к накоплению Q_A в восстановленном состоянии), было высказано предположение, что диурон блокирует перенос электрона между Q_A и вторичным акцептором электрона Q_B (пулом пластохинонов). Далее в целом ряде экспериментов было показано, что диуриновые и триазиновые ингибиторы блокируют транспорт электрона перед пулом пластохинонов; подавляют темновое реокисление электрон-транспортного компонента X-320 (Q_A) [20]. Позже [21, 22] было показано, что ингибиторы диуринового и триазинового типа блокируют транспорт электронов на уровне комплекса пластохинонов ($Q_A Q_B$) и что механизм их действия заключается в понижении среднеточечного окислительно-восстановительного потенциала Q_B относительно Q_A , делающим прямой перенос электрона от Q_A^- к Q_B термодинамически невозможным и тем самым предотвращающим транспорт электрона между ними. Это предположение подтверждалось рядом экспериментальных данных, которые можно было объяснить индуцированием обратного потока электронов от Q_B^- к Q_A в присутствии ингибитора. В 1981–1982 гг. в исследованиях на пурпурных фотосинтезирующих бактериях [23] и на ФС II растений [24] было показано, что Q_B может замещаться молекулой ингибитора в Q_B -связывающем участке. При этом ингибирование транспорта электрона происходит вследствие того, что скорость освобождения молекулы ингибитора с Q_B -связывающего участка во много раз меньше скорости освобождения $Q_B H_2$ [25, 26]. Эти ингибиторы (триазины, мочевины), связанные с Q_B -участком, не могут восстанавливаться от Q_B^- , и транспорт электрона по этой причине прерывается. На основе предложенного механизма замещения пластохинона гербицидом можно объяснить отмеченный ранее [21, 22] факт индуцирования обратного потока электронов от Q_B^- к Q_A в присутствии ингибитора. Перенос электрона $Q_A^- Q_B \leftrightarrow (Q_A Q_B)^- \leftrightarrow Q_A Q_B^-$ обратим и происходит с константой равновесия 10–30 [23–27]. Попав на пластохиноновый комплекс ($Q_A Q_B$), электрон ~95% времени локализован на Q_B (состояние $Q_A Q_B^-$), а остаток времени – на Q_A (состо-

яние $Q_A^- Q_B$). В тот момент, когда $(Q_A Q_B)^-$ комплекс находится в состоянии $Q_A^- Q_B$, пластохинон может покинуть, а гербицид может занять связывающий участок, блокируя связывание нового пластохинона с Q_B -участком. Таким образом, создается впечатление, что ингибитор индуцирует обратный поток электрона от Q_B^- к Q_A [21]. В соответствии с этим объяснением, связывание гербицида значительно уменьшается в комплексах в состоянии $(Q_A Q_B)^-$ по сравнению с комплексами с окисленными пластохинонами [28]. $Q_B H_2$ слабо связан с D1-белком и значительно легче замещается молекулой ингибитора, чем Q_B . В то же время Q_B^- гораздо прочнее связан, чем Q_B [29]. Диурон [30] и атразин [31] замещают пластохинон PQ и пластохинол PQH₂, но не семихинон в Q_B -связывающем участке (измерено по бинарной осцилляции связывающего сродства ингибитора от номера вспышки). Связывание атразина ингибируется в присутствии либо эндогенного пластохинона (в восстановленной форме Q_B^-), либо экзогенного аналога пластохинона [32]. Отмытые от пластохинона тилакоиды эффективно связывают ¹⁴C-диурон, но это связывание нарушается добавлением пластохинона [33]. Замена одной аминокислоты в белке D1, приводящая к появлению устойчивости к целому ряду ингибиторов ФС II, сопровождается значительным (более, чем в 20 раз) уменьшением константы равновесия между Q_A^- и Q_B [23–27]. Это подтверждается также тем фактом, что устойчивые биотипы имеют квантовый выход разделения и стабилизации зарядов на 25–30% меньший, чем у чувствительных растений [34]. Имеется значительное количество данных, свидетельствующих о существовании дополнительных мест действия [35, 36] и целом ряде дополнительных эффектов ингибиторов диуронного и триазинового типов на уровне ФС II. Кроме блокирования переноса электрона на акцепторной стороне ФС II описаны эффекты диурона и на донорной стороне этой фотосистемы [1–4, 37–39]. Показано, что обратимое фотовосстановление Pheo в субхлоропластных кислород-выделяющих препаратах ФС II в анаэробных условиях ингибируется диуроном и реактивируется при последующем добавлении экзогенного донора электрона, аскорбата [3, 4], что может свидетельствовать о способности диурона ингибировать активность донорной стороны ФС II. Уменьшение флуоресценции, связанное с окислением Q_A^- под действием света 1 (свет, возбуждающий преимущественно ФС I, >710 нм), ингибируется диуроном и не реактивируется аскорбатом (в отличие от эффекта, связанного с фотовосстановлением феофитина под действием света 2 [3, 4].

Представлены результаты исследования мест действия четырнадцати ингибиторов ФС II, имеющих разную химическую природу и относящихся к разным типам ингибиторов ФС II [37]. Получены неопровержимые результаты, подтверждающие существование второго сайта ингибирования исследованными агентами на донорной стороне ФС II. Первоначально было обнаружено, что эти ингибиторы подавляют фотовосстановление силикомолибдата тилакоидами хлоропластов, использующими воду в качестве донора электронов [37]. Это указывало на сайт, отличный от хорошо охарактеризованного сайта ингибирования на акцепторной стороне ФС II на D1 белке. Кроме того, на основе данных флуоресценции и способности экзогенного донора электронов, дифенилкарбазида, преодолевать подавление реакции фотовосстановления DCIP в случае всех исследованных ингибиторов кроме бутиадазола, сделано заключение о том, что существует второй участок действия этих ингибиторов на донорной стороне ФС II [37]. Исследовано влияние диурона на относительный средний выход кислорода на одну вспышку в зависимости от времени между вспышками в хлоропластах шпината [38]. Обнаружено, что в концентрации, при которой заблокировано около 80% цепей переноса электронов ФС II, относительный средний выход кислорода на вспышку уменьшается с увеличением темного интервала между вспышками [38]. Сделано заключение о том, что диурон не только действует как ингибитор акцепторной стороны ФС II, но также ускоряет спад положительных зарядов, хранящихся в КВК (кислород-выделяющем комплексе) ФС II [38]. Показано, что подкисление хлоропластов в темноте вызывает снижение способности ферроцианида восстанавливать окисленный цитохром *b*₅₅₉, которое обратимо при повышении pH [39]. Этот эффект подавляется, если в среду перед подкислением добавляется диурон в относительно низких концентрациях (примерно в 4 раза меньших концентраций, необходимых для подавления переноса электрона на акцепторной стороне ФС II) [39]. Выдвинуто предположение, что способность низких концентраций диурона оказывать специфический эффект на *b*₅₅₉ подразумевает, что цитохром *b*₅₅₉ может быть одним из основных сайтов действия диурона [39]. Исследованы эффекты диурона на переходный процесс индукции F хлорофилла (OJIP) у высших растений и обнаружено, что начальный (*F*₀) и максимальный (*F*_M) уровни F листьев, обработанных диуроном, не изменяются относительно контроля, если обработка проводится в полной темноте и диурон медленно диффундирует в листья [40]. Путем одновременного измерения пропускания при 820 нм (измерения потока электронов через ФС I) показано, что в образцах, обработанных диуроном, пул пластохинона остается окисленным во время свето-

вых импульсов, тогда как в необработанных листьях уровень F_M совпадает с уровнем F_M листьев с полностью восстановленной цепью транспорта электронов. Одинаковые значения величин F_M в обработанных и необработанных диуроном образцах указывают на то, что в неповрежденных листьях значение F_M не зависит от окислительно-восстановительного состояния пула пластохинонов [40]. Кроме того, показано, что обычно наблюдаемое увеличение F_0 , вероятно, связано с присутствием (даже очень слабого) света во время обработки диуроном, и что в тилакоидных мембранах в присутствии диурана уровень F_M ниже по сравнению с уровнем F_M контрольного образца [40]. Впервые представлена кристаллическая структура ФС II [41]. Коровые комплексы ФС II выделены из клеток термофильных цианобактерий *Thermosynechococcus elongatus* с ингибитором, связанным с ФС II, тербутрином, с разрешением 3.2 ангстрема [41]. Было обнаружено, что исследованный ингибитор связывается по крайней мере двумя водородными связями с Q_B -сайтом подобно тому, как это имеет место у аноксигенных пурпурных бактерий. Обсуждается связывание ингибиторов с ФС II с точки зрения влияния на окислительно-восстановительный потенциал Q_A [41].

ФЕНОЛЬНЫЕ ИНГИБИТОРЫ СРАВНЕНИЕ ИНГИТОРОВ ФЕНОЛЬНОГО И ДИУРОНОВОГО ТИПА

В 1979 году ингибиторы ФС II окончательно разделили на две большие группы: диуронового и фенольного типа [42]. Замещенные фенолы (диносеб, иоксинил, нитрофен, бромнитротимол, трифлуралин, тринитрофенол, динитро-о-крезол и т. д.) химически значительно отличаются от ингибиторов типа диурана и атразина и, тем не менее, имеют сходный эффект на электронный транспорт, подавляя восстановление пластохинона на акцепторной стороне ФС II [42]. Детальное рассмотрение ингибиторов фотосинтеза представлено в обзорах Гольдфельда и Карапетяна [43, 44]. Диурон вызывает увеличение флуоресценции хлорофилла ФС II, осциллирующее с периодом два в зависимости от номера вспышки [21]. Полагают, что этот подъем F является следствием переноса электрона от Q_B^- к Q_A индуцированного замещением Q_B ингибитором [28]. Подобная осцилляция F была найдена и для атразина, пирозола, диносеба, иоксинила и бромнитротимола с максимумом на четную (вторую) вспышку [45]. При этом измерение F проводили, используя слабый измерительный свет, не способный вызвать подъем F . Добавление гидроксилamina (НА) нарушает донорную сторону ФС II, а электроны, идущие на фотовосстановление Q_B , поставляют-

ся (НА) [46]. Увеличение уровня F_0 , индуцированное добавлением ингибитора после темновой адаптации предварительно освещенных хлоропластов в этих условиях, свидетельствует о блокировании потока электронов на акцепторной стороне ФС II. Иоксинил, трифлуралин и нитрофен, в отличие от диурана, не вызывали увеличения F_0 [22]. В то же время, в работе [45] показано, что иоксинил вызывает увеличение F_0 . При непрерывном освещении нитрофен, трифлуралин, подобно диурону вызывают возрастание F_0 хлорофилла ФС II, а диносеб и иоксинил – нет [22]. В работе [45], наоборот, показано, что только иоксинил вызывает увеличение F_0 . Показано, что фенольные ингибиторы (так же как диурон) блокируют процесс фотопереноса электрона между Q_A и Q_B на серию вспышек света [47], измеряемого по ΔA при 320 нм, связанным с образованием анион-радикала семихинона. Эти ΔA осциллируют с периодом два (с уменьшением поглощения в состояниях $Q_A Q_B$ и $Q_A Q_B H_2$ и увеличением поглощения в состоянии $Q_A Q_B^-$) поскольку состояние $Q_A^- Q_B$ за ~ 200 пс переходит в состояние $Q_A Q_B^-$. Однако после обработки хлоропластов (НА) в темноте и нескольких циклов освещения диносеб вызывает инвертирование ΔA при 320 нм с увеличением на первую и уменьшением на вторую вспышки [47]. Подобный эффект наблюдается при добавлении 4-динитрофенилового эфира 2-иод-4-нитротимола – ингибитора реокисления $PQ_{B}H_2$ пластохинон-пластоцианин оксидоредуктазой [42]. Фенольные ингибиторы значительно отличаются от ингибиторов диуронового и триазинового типа по эффектам на ЭПР-сигналы $Q_A-Fe(II)$ и $Pheo^-$ [48]; полосы термолюминесценции ФС II [49]. Ингибирование переноса электрона между Q_A и Q_B ингибиторами диуронового и триазинового типа приводит к исчезновению В-полосы термолюминесценции ($+30^\circ C$), связанной с рекомбинацией зарядов (B1) $S_2 Q_B^-$, и (B2) $S_3 Q_B^-$ [49]. Вместо нее появляется новая полоса ($10^\circ C$), связанная с рекомбинацией зарядов $S_2 Q_A^-$. Ее обозначают D или Q [49]. Фенольные ингибиторы вызывают сдвиг D-полосы ($15^\circ C$) [49]. Сохранение D(Q) полосы в присутствии фенольных ингибиторов свидетельствует об их действии между Q_A и P_Q -пулом. Разное действие фенольных и диурановых-триазиновых ингибиторов на D-полосу используется для исследования их конкуренции [49]. Применение термолюминесценции для исследования фотосинтетических объектов и действия на них гербицидов подробно описано [49]. Ряд фактов указывают на существование второго места действия фенольных ингибиторов на донорной стороне ФС II. Так, нитрофлуор-

фен, иоксинил, бутидазол, бромиксинил, диносеб подавляют фотовосстановление молибдата кремния [37], акцептирующего электроны до или от Q_A^- . Искусственные доноры электрона (H_2O_2 и дифенилкарбазид) предотвращают блокирование этими ингибиторами фотовосстановления дихлорфенолиндофенола [37]. Однако в более ранней работе [22] показано, что иоксинил и диносеб не подавляют фотосинтетическое выделение кислорода с молибдатом кремния в качестве акцептора электрона. Добавление диурана, атразина, диносеба, иоксинила и бромнитротимола вызывает после предварительной вспышки света высвечивание замедленной люминесценции ФС II. Она обусловлена рекомбинацией отрицательного заряда на Q_A^- и положительного заряда, запасенного на донорной стороне ФС II [45]. При внесении ингибитора диуранового типа замедленная люминесценция на последующие вспышки остается высокой и неизменной. В случае производных фенола происходит постепенное (от вспышки к вспышке) понижение уровня замедленной люминесценции, подобно тому, как это имеет место при добавлении гидроксиланамина (0.1 мМ) [45]. В присутствии диурана вспышка света вызывает подъем F до максимального уровня F_M . Спад F в этом случае происходит в основном за счет рекомбинации отрицательного заряда на Q_A^- и положительного заряда, запасенного на донорной стороне ФС II. Разрушение кислородвыделяющего комплекса гидроксиланмином предотвращает рекомбинацию. В этом случае F сохраняется на максимальном уровне [45]. F_0 измеряли слабым измерительным светом, а перенос электрона индуцировали 25 мс вспышками, следующими с 20 с темновым интервалом. В подобных экспериментах, в отсутствие диурана и НА, показано, что бромнитротимол, диносеб и иоксинил вызывают постепенное увеличение уровня F. При этом десять 25 мс вспышек оказались в 10 раз эффективнее одной 250 мс вспышки. В то же время, определяющей оказалась и длительность темнового интервала [45]. Сделан вывод, что в ингибировании донорной стороны фенольными ингибиторами, происходящем, вероятно, на участке действия НА, задействован некий продукт, образующийся в фотоакте и претерпевающий модификацию в последующей темновой стадии. Ингибиторы диуранового типа не вызывают подобных эффектов. ЭПР сигнал P_S , приписываемый катион-радикалу тирозина-160 белка D2 ФС II, присутствующий в неосвещенных мембранах ФС II, полностью исчезает при добавлении диносеба, но практически не изменяется в присутствии диурана [48]. Подобный эффект вызывают восстановители и некоторые ADRY-агенты [50]. Фенольные ингибиторы вызывают также ускорение темнового спада ЭПР-

сигнала P_S , связанного с фотоокислением вторичного донора электрона тирозина 161 D-белка, в трис-обработанных препаратах ФС II [50]. Этот факт указывает на прямое донирование электрона от ингибитора к Y_Z^+ либо является следствием индуцированных ингибитором изменений, модифицирующих нормальный путь транспорта электронов в ФС II [51]. Диносеб также превращает восстановленную высокопотенциальную форму цитохрома b_{559} , обычно присутствующую в неосвещенных мембранах ФС II, в окисленную низкопотенциальную форму [48]. Добавление фенольных ингибиторов приводит к фотоокислению каротиноидов, регистрируемому по характерному увеличению поглощения при 990 нм после возбуждения вспышкой света, тогда как ни атразин, ни диурон, ни о-фенантролин таких эффектов не вызывают [51]. В порядке уменьшения эффективности окисления каротиноидов они могут быть расположены в следующий ряд: диносеб, бромнитротимол, тринитрофенол, иоксинил, динитро-о-крезол, 2,4-динитрофенол. Количество катион-радикала каротиноида, образованного в присутствии ингибитора, зависит от pH среды и значительно увеличивается при pH ниже 5.5 [51]. При низких значениях pH скорость фотообразования катион-радикала каротиноида в присутствии ингибитора уменьшается при разрушении водоокисляющей системы ФС II [51]. Большинство из рассмотренных свойств характерно для группы соединений, обозначаемых как ADRY-агенты — химических соединений, ускоряющих спад запасающих заряд S-состояний кислородвыделяющего комплекса ФС II [50, 52, 53]. Предполагается, что многие из этих эффектов фенольных ингибиторов обусловлены их прямым взаимодействием с компонентами донорной стороны ФС II. В пользу того, что некоторые ингибирующие эффекты фенольных производных обусловлены их способностью к окислительно-восстановительному взаимодействию с компонентами ФС II свидетельствует ряд литературных данных. Так показано сенситивизированное хлорофиллом фотовосстановление *орто*- и *пара*-динитробенzenов, при этом эффективность восстановления связана с окислительно-восстановительным потенциалом исследованных соединений. Сообщается о восстановлении нитрогрупп до аминогрупп известного ингибитора фенольного класса — диносеба [54]. Показано, что механизм ингибирования фотохимической активности ФС II ингибиторами фенольного класса — ионолом и его аналогами (антиоксидантами фенольной природы A1—A0), вероятно, заключается в способности этих соединений донировать электрон в условиях конкуренции с процессами фотосинтетического окисления воды [55]. Об окислительно-восстановительных превращениях фенольных соединений в хлоропластах сообщается в работе [56].

Предложена модель, согласно которой редокс потенциал Q_A снижается за счет краткосрочных конформационных изменений, вызванных связыванием фенольного ингибитора в Q_B -нише. Обработка НА устраняет это взаимодействие, возможно, обеспечивая большую гибкость в Q_B -сайте [60]. Выявлен новый участок преимущественного связывания диурона, диносеба, ТФБ и ADRY-агентов с новым хинон-связывающим сайтом Q_C и показано, что результатом такого связывания является сдвиг среднеточечного потенциала E_m высокопотенциальной формы цитохрома b_{559} в сторону отрицательных величин в результате окисления гемовой группы цитохрома этими агентами [61]. Представлены данные об эффектах кратковременной обработки клеток зеленой водоросли *Chlorella kessleri* и цианобактерии *Synechocystis salina*, имеющих разную организацию ФС II, ингибиторами семейства фенилмочевин (диурон, изопротурон) и фенольного типа (иоксинил), исследованных методом РАМ-флуориметрии F хлорофилла ФС II и по скорости фотосинтетического выделения кислорода с помощью электродов типа Кларка и типа Жолио [62]. По эффективности ингибирования агенты были расположены в следующем порядке диурон > > изопротурон > иоксинил. Предполагается, что исследованные ингибиторы влияют не только на акцепторную, но и на донорную сторону ФС II, модифицируя Mn-кластер КВК, и что одной из причин разного ингибирования ФС II этими агентами является их влияние в разной степени на кинетические параметры реакций, связанных с выделением кислорода (начальное распределение состояний S_0-S_1 , количество заблокированных центров S_B , время оборота состояний S_i , промахов и двойных попаданий). Обсуждается связь между ингибированием гербицидом и изменением кинетических параметров [62]. Показано, что причиной гибели растения, обработанного ингибиторами ФС II, являются повреждения, вызванные развитием окислительного стресса на свету в результате образования синглетного кислорода в РЦ ФС II. Подробно рассмотрены механизмы развития окислительного стресса при действии на ФС II ингибиторов, относящихся к разным семействам (производные мочевины и триазина и фенольные ингибиторы ФС II) [63]. Методом спиновой ловушки показано фотоиндуцированное образование АФК в ФС II, обработанной ингибитором [64]. Установлено, что в отличие от гидроксильного радикала и супероксидного анион радикала, фотогенерация которых происходила независимо от ингибитора, генерация синглетного кислорода в присутствии ингибиторов была выше, чем без них, причем в случае фенольных ингибиторов в два раза больше, чем с ингибитором на основе мочевины [64]. Это коррелирует с

данными о влиянии этих ингибиторов на редокс свойства семихинона Q_A^- и согласуется с гипотезой о том, что синглетный кислород образуется в реакциях рекомбинации заряда, которые стимулируются связыванием ингибитора и модулируются его природой. В случае, когда с ФС II связаны фенольные ингибиторы, рекомбинация заряда на уровне первичной ион-радикальной пары [$P_{680}^+ Pheo^-$] термодинамически благоприятствует образованию триплета хлорофилла и, следовательно, синглетному кислороду. В случае ингибиторов на основе мочевины этот путь менее благоприятен [64]. В результате исследования разностных спектров Фурье-спектроскопии (FTIR – Fourier-transform infrared spectroscopy) при фотовосстановлении предварительно окисленного негемового железа (разница Fe2p/Fe3p) на мембранах ФС II в присутствии бромоксирила или иоксинила получены данные о структуре, взаимодействии и расположении фенольных ингибиторов в Q_B -сайте, которые помогли прояснить молекулярный механизм сдвигов редокс потенциала Q_A в присутствии этих агентов [65]. Расчеты взаимодействия ингибиторов с Q_B -сайтом, произведенные на основе полученных данных, подтвердили связывание депротонированного бромоксирила с D1-His215, тогда как протонированная форма бромоксирила и диурон связывались с противоположной стороной Q_B -кармана без взаимодействия с D1-His215. На основании этих результатов предполагается, что сильная водородная связь фенолятной СО-группы с D1-His215 вызывает изменение прочности водородной связи Q_A -СО-группы через мостик Q_A -His-Fe-His-фенолят, вызывая соответствующий сдвиг редокс потенциала Q_A [65].

ADRY-АГЕНТЫ

Ранее были описаны соединения, дестабилизирующие S_2 и S_3 состояния КВК (ANT-2p, ANT-2s, TPB и FCCP) [52, 66, 67], которые были обозначены как ADRY-агенты (Acceleration of the Deactivation Reactions of the water splitting system Y). ANT-2p считается наиболее эффективным среди ADRY-агентов [52]. Внесение только одной молекулы ANT-2p на 40 реакционных центров ФС II оказывается достаточным, чтобы вызвать значительное ускорение спада всех 5-ти состояний. ADRY-агенты действуют как очень подвижные катализаторы внутри тилакоидной мембраны, реагируя с водоокисляющей ферментной системой независимо от ее окислительно-восстановительного состояния и образуя с ней переходный комплекс. Предполагается, что происходит быстрый обмен молекулы ADRY-агента между связывающими участками. Многочисленные вычисления и эксперименты по измерению ТЛ [68] свидетельствуют о

высоком сродстве ADRY-агентов к водоокисляющей ферментной системе, с константой диссоциации порядка 0.01 мкМ. В хлоропластах с неповрежденным КВК компонент, D_1^+ окисленный хлорофиллом P_{680}^+ , ревосстанавливается электронами от КВК менее, чем за 1 мс, так что ADRY-агенты практически не могут предотвратить образование S_2 и S_3 состояний, не успевая конкурировать с ними за восстановление D_1^+ . Поэтому считается, что S_2 и S_3 состояния атакуются непосредственно ADRY-агентами. В обработанных трисом хлоропластах D_1^+ сохраняется в окисленном состоянии, и в этом случае индуцированный ADRY-агентами восстанавливающий эффект на донорной стороне направлен уже на D_1^+ , скорее всего, посредством еще не установленного эндогенного донора электронов [69]. В нормальных хлоропластах, в которых спад S_2 и S_3 состояний, индуцированный ADRY-агентами, происходит через одноэлектронный переход, D_1^+ мог бы участвовать в индуцированном ADRY-агентами восстановлении S_2 и S_3 состояний, действуя как интермедиат в переносе электрона [66, 67]. ADRY-агенты не влияют на свойства $S_0 \rightarrow S_1$ перехода [69]. Показано, что все ADRY-агенты – разобшители, которые имеют кислую NH или OH группу с рК между 5.5 и 6.0 [70], ковалентно связанные с ароматической системой электронов. После замещения протона в вышеназванных группах эти вещества полностью теряют их ADRY-активность [66]. Высокие концентрации (>10 мкМ) СССР, типичного разобшителя фосфорилирования, ингибируют реакцию Хилла в изолированных хлоропластах [71]. Это ингибирование стимулируется светом [72] и сопровождается обесцвечиванием каротиноидов [73], которое может предотвращаться восстанавливающими агентами и диуроном [73]. СССР в этих же концентрациях понижает выход флуоресценции хлорофилла ФС II [72]. Ингибирование, индуцированное СССР, отличается от ингибирования аминами тем, что ни один из известных доноров электрона не способен восстановить транспорт электронов в ФС II, ингибированной СССР [71, 74], или повысить подавленную СССР флуоресценцию хлорофилла [72, 74]. Добавление диурана или дитионита все же увеличивает выход флуоресценции хлорофилла, но этот стимулирующий эффект быстро исчезает, если концентрация СССР превышает 0.1 мМ. При этом не происходит освобождения Mn [74], поэтому было высказано предположение, что СССР действует непосредственно на первичный донор электрона ФС II [72] или в непосредственной близости к нему [74]. Тетрафенилборон обладает всеми эффектами СССР, и его ингибирующее действие связано со

способностью восстанавливать некий окисленный донор электрона в ФС II [75]. Низкие концентрации СССР значительно укорачивают время жизни интермедиатов КВК. Аминотиофены обладают подобным эффектом [76]. ADRY-соединения индуцируют образование цикла внутри ЭТЦ ФС II, в котором некий донор электрона (отличный от Q_A) восстанавливает S_2 и S_3 состояния [67]. В присутствии СССР выход O_2 на вспышку уменьшается, если темновой интервал между вспышками увеличивается [77]. ADRY-агенты полностью ингибируют замедленную люминесценцию (по крайней мере, в диапазоне >50 мс) [78]. ЭПП сигнал II спадает на 50–60% в течение 12 ч в темноте *in vivo* и за 1 час *in vitro*. Спад этого сигнала значительно ускоряется в присутствии СССР или NH_2OH [79]. ANT-2p, TPB и FCCP (подобно липофильным анионам) стимулируют фотообразование катиона каротиноида [53], возможно, понижая величину среднеточечного редокс потенциала, (E_M) каротиноидов и позволяя, таким образом, P_{680}^+ стать эффективным окислителем. TPB, FCCP, СССР и TMPD окисляют цитохром b_{559} (вызывают превращение цитохрома b_{559} из высокопотенциальной в низкопотенциальную форму после их окисления вторичным донором электрона ФС II– Y_Z^+ или катион-радикалом Car^+ [80, 81]). Многие свойства FCCP и других разобшителей пытаются объяснить их способностью образовывать липофильные анионы [53, 82]. В то же время способность стимулировать фотообразование катиона каротиноида не зависит ни от pH, ни от рК (для FCCP рК = 5.9) исследованных ADRY-агентов [51]. Способность выступать в качестве окислительно-восстановительного катализатора при взаимодействии с компонентами ФС II была проанализирована на основе данных об электрохимических свойствах ANT-2p и некоторых его структурных аналогов (ANT-2a и ANT-2f) [83]. При проведении циклической вольтамперометрии в водных средах на платиновом электроде ANT-2p и его аналога ANT-2a в каждом случае был выявлен отчетливо выраженный пик окисления в диапазоне потенциалов от +0.9 до +1.0 В. Отсутствие пика при развертке потенциала в восстановительную сторону показало, что образовавшийся продукт окисления этих агентов не способен обратно восстанавливаться. Однако в случае ANT-2f (аналога, не обладающего ADRY-активностью даже при соотношении 50 молекул на ФС II) имелись четко выраженные пики восстановления продукта окисления этого агента [83]. Полученная величина потенциала окисления ANT-2p (1.0 В) показывала, что в ФС II ANT-2p может быть окислен только первичным донором электрона, хлорофиллом P_{680} . На основе полученных данных был сделан вывод о том, что ADRY-эффект ANT-2p, обуслов-

ленный обратимой окислительно-восстановительной реакцией, представляется маловероятным [83]. Показано, что ни ANT-2p, ни о-фенантролин, ни диурон не способны подавлять фотохимическую активность изолированных D1/D2/цит. b_{559} реакционных центров ФС II [84]. Ни один из этих указанных выше агентов не ингибировал фотоиндуцированный перенос электрона от экзогенного донора электрона дифенилкарбазида к экзогенному акцептору электрона силикомолибдату независимо от того, добавлялись указанные агенты до или после добавления силикомолибдата [84]. Показано, что в хлоропластах Ant-2p по-разному действует на разные популяции высокопотенциальной формы цитохрома b_{559} (cytb₅₅₉HP) [85]. В присутствии Ant-2p, начиная с 1 мкМ и выше, примерно половина cytb₅₅₉ подвергается автоокислению в темноте. Эта фракция cytb₅₅₉HP подвергается быстрому фотовосстановлению с последующим повторным окислением в темноте. Фотовосстановление может ингибироваться диуроном, но не DBMIB, что предполагает участие в этой реакции Q_A или пула пластохинонов. Другая фракция cytb₅₅₉HP подвергается медленному необратимому фотоокислению в присутствии более низких концентраций Ant 2p [85]. Получены экспериментальные данные об электрохимических свойствах ADRY-агента, (2-(3-хлор-4-трифторметил)-анилин-3,5-динитрофенола) – ANT-2p [86]. Выяснено, что в апротонных растворителях ANT-2p необратимо окислялся при потенциале 1.35 В и необратимо восстанавливался при потенциале –0.03 В. Методом циклической вольтамперометрии определены потенциалы продуктов окисления и восстановления, они составили 0.45 и 0.27 В соответственно [86]. Высказано предположение от том, что наиболее вероятным механизмом взаимодействия ANT-2p с компонентами ФС II может быть первичное восстановление этого агента на акцепторной части ФС II, окисление его образовавшейся восстановленной формы любым окисленным компонентом донорной стороны ФС II и последующая регенерация окисленной формы на акцепторной стороне этой фотосистемы [86]. Возможен был и другой путь (окислительный), когда первичным актом было бы окисление на акцепторной стороне ФС II. Однако авторы публикации считают его менее вероятным с энергетической точки зрения [86]. Показано, что карбонилцианид м-хлорфенилгидразон (СССР) в хлоропластах ингибировал реакцию Хилла с феррицианидом (Fe₃Su) в качестве экзогенного акцептора электрона и сопряженное с этой реакцией фотосинтетическое выделение кислорода изолированными хлоропластами [87] и подавлял фотосинтетическое выделение кислорода, сопряженное с фотовосстановлением силикомолибдата (SiMo) [87], но лишь незначительно

уменьшал фотовосстановление SiMo. Аналогичные результаты были получены и для другого ADRY-агента, ANT2p [87]. Ингибирование указанных фотореакций было максимальным при значениях pH, соответствующих рК СССР (5.95). СССР не ингибировал перенос электрона от восстановленного TMPD или дуохинола к метилвиологену, т. е. с участием только ФС I [87]. СССР не влиял на наносекундную флуоресценцию хлорофилла в хлоропластах, инкубированных при низкой интенсивности света, но приводил к ее уменьшению при высокой интенсивности света. Эффективность ингибирующего действия СССР на фотовосстановление FeSu зависит от скорости потока электронов, которая контролируется интенсивностью света [87]. Методом циклической вольтамперометрии СССР в водном буфере выявлен хорошо разрешаемый пик окисления с соответствующим окислительно-восстановительным потенциалом равным +1.17 В. Последующая восстановительная развертка вольтамперограммы показала пик восстановления с окислительно-восстановительным потенциалом равным +0.34 В [87]. Сделано заключение, что СССР окисляется на донорной стороне ФС II с последующим восстановлением на акцепторной стороне электронами от мембранного пула пластохинона, конкурируя за электроны с Fe₃Su и комплексом цитохрома *b/f* и образуя, таким образом, циклическую цепь переноса электронов вокруг ФС II. Предполагается, что исследованные агенты служат донорами протонов, а не просто донорами электронов на окисляющей стороне ФС II [87]. Получены данные о влиянии СССР на ФС II в тилакоидах методом регистрации полифазных кинетик индукции быстрой флуоресценции хлорофилла ФСII (OJР-тест) [88]. Показано, что в отсутствие других добавок СССР в малых концентрациях увеличивал величину выхода F хлорофилла на J-этапе, выход F на P-этапе оставался неизменным. При постепенном повышении концентрации СССР выход флуоресценции на J-шаге продолжал постепенно увеличиваться, а выход F на P-шаге начинал постепенно уменьшаться. Кроме того, уже при этих концентрациях СССР подобно диурону начинал проявляться эффект постепенного увеличения уровня F на шаге O (F₀), наиболее выраженным это увеличение становилось при более высоких концентрациях СССР (60 мкМ и особенно 290 мкМ) [88]. В высокой концентрации СССР вызывал ярко выраженное снижение F на шаге P. Возможные детали действия СССР на ФС II в тилакоидах на полифазную кинетику индукции быстрой флуоресценции хлорофилла ФС II на этапе от J к P были исследованы в присутствии окисленной формы TMPD (TMPD-ox – агент, увеличивающий мембранный пул окисленного пластохинона за счет окисления пластохинола) в условиях, инициирующих фотоинду-

цированное проявление отчетливого I-пика в ОЖР-кинетике [88]. Показано, что в присутствии TMPD, СССР при постепенном повышении концентрации, начиная с малых концентраций, также постепенно увеличивал выход F хлорофилла на J-этапе и уровень O (F_0) и приводил к постепенному снижению выхода F на P-этапе. Зависимое от концентрации СССР возрастание выхода F на J-этапе происходило до достижения максимума равного F на I-этапе, тогда как величина F на этапе P продолжала уменьшаться [88]. Ускоренное возрастание F на J-этапе, вызванное СССР, вероятно, можно объяснить подавлением нефотохимического тушения F Хл ($S_2 + S_3$)-состояниями кислород-выделяющего комплекса и окисленного P_{680} , первичного донора электрона ФС II [88].

ПРОИЗВОДНЫЕ ПФИПДНБ

Недавно была разработана и синтезирована группа новых химических агентов, производных ПФИПДНБ, как ожидалось, возможных потенциальных ингибиторов фотосинтетической активности. Был проведен первичный скрининг, отобраны агенты, действовавшие с разной степенью эффективности на фотосинтетическую активность тилакоидов, и подробно исследовано их действие на функциональную активность фотосинтетического аппарата [6, 9–16]. Далее будет использовано также обозначение K15 – одного из самых эффективных соединений (4-[метоксибис(трифторметил)метил]-2,6 динитрофенилгидразон метил кетона), чье действие на исследованные реакции характерно практически для всей группы исследованных агентов. Было показано, что производные ПФИПДНБ подавляли индуцированное светом выделение O_2 и восстановление НАДФ⁺ хлоропластами, нарушая транспорт электронов от воды к НАДФ⁺, но не влияли на фотовосстановление НАДФ⁺ в условиях, когда в эту реакцию была вовлечена только ФС I. Эти данные, тот факт, что производные ПФИПДНБ подавляли также индуцированные светом ΔF ФС II у хлоропластов и у субхлоропластных препаратов ФС II, а также совпадение зависимостей этих эффектов от концентрации K15 указывало на то, что место действия данных соединений находится на уровне ФС II.

Было показано, что уже в концентрации 10–15 нМ K15 вызывал снижение уровня F_M за счет уменьшения величины ΔF на 15%. В концентрации 80–360 нМ K15 еще больше снижал фотоиндуцированные ΔF вплоть до 90%. Величина I_{50} , концентрация ингибитора, вызывающая 50%-е подавление ΔF , для K15 равнялась 70 нМ [9]. Ингибирующее действие на ΔF полностью сохранялось при длительном (>5 мин) освещении акти-

ничным светом даже при использовании очень малых концентраций ингибитора. Этот факт, а также отсутствие ускорения темновой релаксации ΔF , связанной с фотовосстановлением Q_A , свидетельствовали о том, что подавление ΔF и понижение общего уровня F, вероятно, не являлось следствием акцептирования электронов агентом K15 от Q_A^- [9]. С другой стороны, ΔF ФС II, подавленные агентом K15, не реактивировались последующим добавлением экзогенных доноров электрона ФС II независимо от последовательности внесения реагентов [9]. Известно, что понижение F_M за счет подавления ΔF наблюдалось в результате полного удаления эндогенного Mn при инактивации донорного участка ФС II. Однако при этом, в отличие от K15, добавление экзогенных доноров электрона ФС II восстанавливало ΔF практически до исходного значения, как это неоднократно отмечалось и ранее [3]. Было предположено, что подавление фотоиндуцированных ΔF ФС II агентом K15, вероятно, не связано с блокированием переноса электронов на донорной стороне ФС II [9].

В отличие от диурана, K15 не блокировал перенос электрона на акцепторной стороне ФС II, т. к. не приводил ни к увеличению уровня F_0 ни к замедлению темнового спада ΔF [9]. Кроме того, K15 (в отличие от диурана) не приводил к прерыванию взаимодействия ФС II и ФС I через цепь переноса электронов, измеряемого по уменьшению F ФС II вследствие окисления Q_A при дополнительном возбуждении ФС I в хлоропластах.

Ингибирующие эффекты K15 на ΔF ФС II полностью устранялись в присутствии дитионита (>0.8 мг/мл). Флуоресценция поднималась до максимального уровня. Включение актиночного света приводило к тому, что F уменьшалась, приводя к отрицательным значениям ΔF , отражающим восстановление Pheo. Полосы поглощения K15 при 200–500 нм с максимумом при 420 нм исчезали, свидетельствуя о темновом восстановлении K15 дитионитом [9].

Ранее [4] было показано, что индуцированное светом восстановление Pheo до Pheo⁻ в ФС II возможно в анаэробных условиях. В этом случае F также достигала уровня F_M вследствие фотовосстановления Q_A до Q_A^- слабым измерительным светом, а при освещении актиночным светом наблюдалось уменьшение флуоресценции ($-\Delta F$) и изменения поглощения (ΔA), связанные с обратимым восстановлением Pheo. Внесение 30–40 нМ K15 приводило к резкому (более, чем в 15–20 раз) ускорению темновой релаксации соответствующих ΔA и $-\Delta F$, указывая на возрастание скорости темнового окисления Pheo⁻ [9].

В больших концентрациях агент K15 вызывал значительное уменьшение фотоиндуцированных

$-\Delta F$ и ΔA , а также уменьшение уровня F_M . При этом освещение актиничным светом не вызывало увеличения F , связанного с фотовосстановлением Q_A . Однако при использовании вместо K15 известных акцепторов электрона ФС II, вызывающих темновое окисление Q_A , подобное уменьшение F в анаэробных условиях сопровождалось появлением фотоиндуцированного увеличения F . Диурон в концентрации до 50–100 мкМ не изменял ни кинетику, ни величину ΔA и $-\Delta F$, связанных с фотовосстановлением Pheo, ни величину F_M в анаэробных условиях [9].

В дополнительных экспериментах было показано, что K15 в концентрации до 100 мкМ не уменьшает F хлорофилла светособирающих пигмент-белковых комплексов, а также раствора хлорофилла в 1% тритоне X-100. Резкое ускорение темновой релаксации спектральных эффектов, отражающих светоиндуцированное восстановление Pheo в результате реакции $[P_{680}Pheo]Q_A^- \rightarrow [P_{680}Pheo^-]Q_A^-$, и, как следствие этого, уменьшение величины этих эффектов свидетельствовали в пользу того, что в присутствии K15 значительно сокращается время нахождения Pheo в восстановленном состоянии ввиду его быстрого реокисления. Тогда уменьшение величины положительных ΔF в аэробных условиях и понижение уровня F_M в анаэробных условиях могло быть интерпретировано как результат ускорения распада пары $[P_{680}^+Pheo^-]$, индуцированного соединениями K15 вследствие окисления Pheo⁻ [9].

Можно было бы предположить, что действие K15 на окислительно-восстановительное состояние Pheo было обусловлено не прямым его участием в акцептировании электрона от Pheo⁻, а, например, вследствие увеличения доступа кислорода к Pheo⁻. Однако сохранение характерной эффективности ингибирующего действия K15 и в анаэробных условиях свидетельствовало против этого предположения [9].

В то же время ингибирующее действие соединений K15 нельзя было объяснить только акцептированием электронов от Pheo⁻. Ведь в таком случае должен был бы наблюдаться эффект истощения ингибирующего действия K15 при длительном освещении вследствие накопления ингибиторов в восстановленном состоянии, чего в действительности не происходило [9].

Ранее было показано, что скорость фотоиндуцированных ΔF , отражающих обратимое фотовосстановление Pheo, в восстановительных условиях (в присутствии дитионита) на препаратах ФС II, лишенных Mn, возрастает в 1.5–2 раза при добавлении экзогенного донора электрона, Mn^{2+} [3]. Подобный эффект наблюдался также в присутствии K15 [9]. Скорость темнового окисле-

ния Pheo⁻ при этом не изменялась. Ускорение реакции фотовосстановления Pheo при добавлении K15 в присутствии дитионита указывало на способность восстановленной дитионитом формы K15 донировать электроны на компоненты РЦ ФС II.

Добавление K15 приводило к уменьшению величины фотоиндуцированных ΔA при 678 нм, связанных с фотоокислением первичного донора электрона P_{680} , в препаратах ДТ20, лишенных Mn, в присутствии феррицианида калия и молибдата кремния. Подобное уменьшение величины ΔA при 678 нм наблюдалось также и ранее при добавлении к таким препаратам Mn^{2+} (0.1–3 мкМ), приводящим к реактивации донирования электрона на РЦ ФС II [9]. Агент K15 подавлял также ΔA при 820 нм, связанные с фотоокислением P_{680} при измерении этой фотореакции с микросекундным временным разрешением как в присутствии, так и в отсутствие феррицианида калия и молибдата кремния. Кроме того, производные ПФИПДНБ подавляли также фотоиндуцированный ЭПР-сигнал II, связанный с фотоокислением вторичного донора электрона Z.

Было показано, что производные ПФИПДНБ (K15) ингибировали перенос электрона в изолированных комплексах D1/D2, цит. b_{559} РЦ ФС II, измеренный по фотохимическому восстановлению молибдата кремния в присутствии дифенилкарбазида и фотоокислению хлорофилла P_{680} с эффективностью, сравнимой с таковой для субхлоропластных препаратов, обогащенных ФС II [12].

Производные ПФИПДНБ вызывали резкое падение квантового выхода и уменьшение длительности медленной (наносекундной) компоненты кинетики затухания F . Длительность и амплитуда быстрой (300 пс) компоненты F практически не изменялась. В присутствии дитионита ПФИПДНБ не влияли на ФС II, при этом длительность и относительный вклад квантового выхода медленной компоненты F принимали свои исходные значения, а кинетика затухания полностью, совпадала с контрольной [6]. Эти данные указывали на увеличение скорости распада первичной ион-радикальной пары $[P_{680}^+Pheo^-]$ за счет взаимодействия ПФИПДНБ с компонентами РЦ ФС II [6].

Совпадение концентрационных зависимостей ингибирующего действия ПФИПДНБ для всех рассмотренных выше фотореакций, а именно: 1) фотоиндуцированных ΔF , связанных с фотоиндуцированным восстановлением Q_A , 2) величины F_M в анаэробных и в аэробных условиях, 3) фотоиндуцированных $-\Delta F$ и ΔA при 685 нм, связанных с фотоиндуцированным восстановлением Pheo, а также 4) фотоиндуцированных ΔA при 678 нм, связанных с фотоокислением хлорофилла

P_{680} , свидетельствовало об единой природе их ингибирования [9]. Предполагалось, что ПФИПДНБ, принимая электрон от $Pheo^-$ и передавая его на Y_Z^+ (или непосредственно на P_{680}^+), замыкали перенос электрона в ФС II. Не исключалось, что производные ПФИПДНБ, попадая в РЦ ФС II, выполняли роль, подобную Q_A , или даже замещали Q_A . Было показано, что окислительно-восстановительный потенциал ПФИПДНБ лежит в области -400 мВ. Вследствие этого, принимая электрон от $Pheo^-$, производные ПФИПДНБ, (в отличие от Q_A , имеющего потенциал около -0.130 мВ), не способны задерживать его на достаточно длительное время, и он вновь возвращается на P_{680}^+ или на Y_Z^+ , что и приводило к нарушению базального переноса электрона в ФС II [9].

Было показано, что величина I_{50} для подавления реакций ФС II в случае наиболее активных ПФИПДНБ составляет от 50 нМ до 0.1 мкМ, что соответствует примерно одной молекуле ингибитора на РЦ ФС II. У менее активных соединений она достигала значения 1 мМ, т. е. более 1000 молекул на РЦ ФС II [10]. В результате исследований зависимости ингибирующей эффективности в ряду ПФИПДНБ от некоторых физико-химических свойств молекулы ингибитора было показано, что более высокая (в ~ 100 раз) ингибирующая активность в ряду исследованных ПФИПДНБ у соединений, имеющих две нитрогруппы (NO_2) в структуре молекулы по сравнению с соединениями с одной нитрогруппой [10]. Этот факт свидетельствует в пользу того, что в окислительно-восстановительные превращения, ответственные за процесс подавления электронного транспорта в ФС II, вовлечены, вероятно, нитрогруппы бензола. Была выявлена положительная зависимость между повышением ингибирующей эффективности и увеличением степени гидрофобности молекулы исследованных ПФИПДНБ, а, следовательно, степени доступности молекулы ингибитора к участку ее связывания, находящемуся, судя по функциональным данным, на уровне промежуточного акцептора электрона ФС II феофитина, расположенного в гидрофобной области РЦ [10]. Для исследованных производных ПФИПДНБ был проведен поиск количественных соотношений структура-свойство — QSAR-анализ (Quantitative Structure-Activity Relationship). Были получены данные количественной зависимости эффективности ингибирования от структуры ингибитора, которые показали, что эффективность ингибирующего действия соединений типа K15, в основном, зависит от наличия второй нитрогруппы в составе молекулы и степени липофильности боковых заместителей [89]. Зависимость ингибирующей активности от степени гидрофобности для известных гербицидов (в том числе и фенольного класса) отмечалась и

ранее [8]. С другой стороны, заместители боковой цепи ингибитора, вероятно, влияют на степень пространственного соответствия между структурой молекулы ингибитора и конфигурацией связывающей ниши [10].

В водных растворах в присутствии детергента при pH 8.0 большая часть исследованных ПФИПДНБ принимает первый электрон при потенциалах от -0.28 до -0.41 В (нормальный водородный электрод). Восстановление не обратимо, зависимость потенциала восстановления от pH составляет 60 мВ/pH, что свидетельствует о протонировании восстановленных форм [11]. Наибольший интерес представляет поведение ингибиторов в неводных растворах, в апротонной среде, поскольку вследствие своей липофильности они способны встраиваться в гидрофобные области фотосинтетических мембран. Показано, что в безводном диметилформамиде большинство исследованных ПФИПДНБ способно к одноэлектронному обратимому восстановлению при потенциалах от -0.3 до -0.53 В [11]. Эти результаты позволяют обосновать предложенный выше механизм ингибирующего действия ПФИПДНБ, заключающийся в их окислительно-восстановительном взаимодействии с парой [$P_{680}^+Pheo^-$]. Значения редокс-потенциалов ингибиторов подтверждают их способность к перехвату электрона в реакционных центрах ФС II на уровне $Pheo^-$, а обратимость восстановления указывает на возможность быстрого возврата электрона от восстановленного ингибитора на подходящей акцептор, которым могут быть P_{680}^+ или Y_Z^+ . Показана зависимость ингибирующего действия от редокс-потенциала исследованных соединений [11].

В пользу достоверности предполагаемого механизма действия производных ПФИПДНБ свидетельствует также данные полученные в работе Аллаhverдиева с соавт. [13]. Было показано, что циклический транспорт электронов вокруг ФС II, образующийся при участии агента K15, эффективно защищает ФС II от фотоингибирующего повреждения как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Тушение максимального уровня флуоресценции и уменьшение изменений оптической плотности при 685 нм, связанные с фотовосстановлением феофитина, наблюдаемым при фотоингибирующем освещении необработанных или лишенных эндогенного Mn субмембранных фракций ФС II; фотодеградация цитохрома b_{559} и фотообесцвечивание β -каротина и хлорофилла-670 измеренные в препаратах, лишенных эндогенного MnФС II, значительно ослабляются в присутствии K15 [13].

Для идентификации ПФИПДНБ использовали их способность испускать характерную флуоресценцию при $440-450$ нм при возбуждении на

длине волны 270 нм. Показано, что ПФИПДНБ прочно связываются с ФС II: только промыванием в присутствии детергента удается удалить K15 из препаратов ФС II. Это свидетельствует в пользу высокой аффинности связывания ПФИПДНБ в ФС II, которое имеет, вероятно, нековалентную природу [15].

Методом фотоаффинного мечения с использованием азидсодержащего аналога ПФИПДНБ (K15-N₃) показано, что в препаратах ФС II до и после удаления суммы водорастворимых белков ПФИПДНБ интенсивно метят одну белковую полосу в области 30–34 кДа (исходя из условий проведения ПААГ электрофореза, вероятно, D2-белок) и, в меньшей степени, полосу в области 65–55 кДа (гетеродимер D1- и D2-белков) [15].

В препаратах РЦ ФС II в присутствии 6 М мочевины удается отчетливо разделить полосы D1- и D2-белков. В этих препаратах фотоаффинно связанные ПФИПДНБ метят только полосы 30 кДа и 55 кДа. Учитывая данные об аномальном изменении электрофоретической подвижности гербицид-хинон-связывающего белка D1 в зависимости от концентрации мочевины в среде [90, 91], сделан вывод о том, что местом связывания исследованных ПФИПДНБ, вероятно, может быть D2-белок [15]. В пользу достоверности этого предположения свидетельствуют также данные о преимушественной защите белка D2 от фотодеструкции в изолированных комплексах D1/D2/цитохром *b*₅₅₉ с помощью K15 [14].

В результате исследований способности диурона “снимать” ингибирующее действие ПФИПДНБ путем регистрации тушения уровня F_M хлорофилла ФС II (связанного с восстановлением Q_A) в анаэробных условиях, в присутствии ПФИПДНБ (K15) было показано отсутствие конкуренции между ПФИПДНБ и диуроном за участок связывания с РЦ ФС II [16]. Этот факт подтверждает предположение о том, что местом связывания ПФИПДНБ служит, вероятно, белок D2, несущий на себе, как известно, акцептор Q_A . Полученные результаты отклоняются от принятой схемы связывания гербицидов с ФС II, но в то же время согласуются с результатами функциональных измерений, обосновывающими предполагаемый механизм ингибирующего действия ПФИПДНБ на ФС II [6, 9–16].

МЕТАЛЛСОДЕРЖАЩИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ КОМПЛЕКСЫ

Исследовано действия новых химических соединений производных сульфида и их комплексов с ионами меди (Cu), никеля (Ni), хрома (Cr), кобальта (Co) и цинка (Zn) (30 соединений) на обратимую реакцию гидратации двуокиси углерода и скорость фотосинтетического транспорта электрона осуществляемых ФС II [17]. Из них

одиннадцать агентов являются органическими основаниями, двадцать четыре – их органическими производными, а четырнадцать – их комплексами с некоторыми атомами металлов. Эти соединения исследованы на предмет выявления их действия на фотосинтетическую активность (ФС II), а также на карбоангидразную активность (КАА) ФС II и альфа карбоангидразы (КА) из эритроцитов быка. Среди этих агентов было выявлено несколько групп ингибиторов [17]. Некоторые из них оказались способны подавлять одну, две или все из исследованных активностей. Примером подавления всех исследованных активностей служит, медь(Cu(II))-содержащий комплекс производного фенилсульфонилгидрозола (соединение 25), который подавляет КАА альфа-КА на 88%, КА ФС II на 100% и ФС II на 66.2%. Агенты на основе Шиффова основания (соединения 12 и 15) и медь(Cu(II))-содержащие комплексы на основе фенилсульфонилгидрозола (соединения 25 и 26) значительно ингибируют КАА и ФС II [17]. Методами циклической вольтамперометрии, квадратно-волновой вольтамперометрии, хроноамперометрии, а также методом объемного электролиза также определен целый ряд электрохимических параметров (коэффициент диффузии, количество переносимых электронов, константа скорости гетерогенной реакции, наклон Котрелла, предельный ток на ультрамикрореле, потенциал пика E_{pc}) для всех 30 производных сульфида и их комплексов с ионами металла. Кроме того, определены значения констант кислотной диссоциации pK_a новых соединений в неводных и водных средах. Выявлена зависимость эффективности подавления указанных реакций ФС II от физико-химических свойств исследованных агентов [17].

Исследованы эффекты девятнадцати металл-органических комплексов, содержащих катионы сурьмы(III) на фотосинтетический перенос электрона и карбоангидразную активность ФС II, а также глутатионредуктазную активность хлоропластов и глутатион редуктазы из дрожжей (*S. cerevisiae*) [18]. Шесть из них были разработаны и синтезированы впервые, и их структуры были идентифицированы с использованием элементарного анализа, ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, ИК-Фурье, LCMS, магнитной восприимчивости и путем измерения проводимости. Для всех девятнадцати исследованных комплексов, содержащих катионы сурьмы(III), их наиболее устойчивые формы были определены методом DFT/B3LYP/LanL2DZ. Среди исследованных комплексов были выявлены агенты, эффективно подавляющие одну две, три или сразу все четыре из исследованных активностей [18].

Разработан, синтезирован, охарактеризован и исследован в качестве ингибиторов фотосинтетической и карбоангидразной активности ФС II,

α -карбоангидразы из эритроцитов быка, а также активности глутатионредуктазы из хлоропластов и классической глутатионредуктазы из дрожжей (*S. cerevisiae*) новый класс металлсодержащих органических комплексов на основе ионов меди Cu(II) [19]. Среди новых агентов выявлены Cu(II)-содержащие комплексы и лиганды, эффективно ингибирующие глутатионредуктазу, α -карбоангидразу, карбоангидразную и фотохимическую активность ФС II [19].

ИНГИБИТОРЫ КАРБОАНГИДРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ФС II

Ранее были выявлены четыре источника карбоангидразной активности в субхлоропластных мембранных частицах, обогащенных ФС II – гидрофильные белки кислородвыделяющего комплекса ФС II с молекулярными массами 33 (белок PsbO), 24 (белок PsbP) и 18 кДа (белок PsbQ), а также источник КАА, остающийся связанным с пигмент-белковым комплексом ФС II после удаления трех гидрофильных белков с помощью солевой обработки [92].

Было показано, что истощение ФС II по $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$, а также подавление карбоангидразной активности ФС II известным ингибитором α -карбоангидраз, ацетазоламидом (AZM), сопровождается снижением скорости переноса электронов на донорной стороне ФС II. Ингибирование, вызванное AZM, полностью устраняется HCO_3^- или известными искусственными донорами электрона (ферроцианидом калия и TMPD). Был сделан вывод о том, что для максимальной фотосинтетической активности ФС II необходимо ее карбоангидразная активность. Однако не исключено, что AZM мог иметь два независимых механизма действия на ФС II: специфический и неспецифический [93].

Чтобы исследовать специфическое влияние ингибирования карбоангидразной активности ФС II на ее фотосинтетическую активность, был использован другой известный ингибитор α -карбоангидраз, неисследованный ранее по его эффектам на карбоангидразную и фотосинтетическую активность ФС II, трифторметансульфонамид (TFMSA). Молекулярная структура TFMSA и его физико-химические свойства сильно отличаются от таковых AZM [94]. Впервые было показано, что TFMSA одновременно с подавлением карбоангидразной активности ФС II вызывает также снижение: 1) величины фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции хлорофилла ФС II и 2) скорости фотосинтетического выделения кислорода [94]. Добавление экзогенных доноров электрона ФС II или HCO_3^- приводило к исчезновению ингибирующего действия TFMSA на перенос электрона в ФС II, указывая на то, что

сайт ингибирования TFMSA расположен на донорной стороне ФС II [94].

ПРИМЕНЕНИЕ ИНГИБИТОРОВ ФС II

Имеются публикации, свидетельствующие о значимости ингибиторов ФС II как в качестве инструментов научного познания, так и для реального практического использования. Показано существенное увеличение фотоиндуцированной генерации молекулярного водорода клетками морской зеленой водоросли *Platymonas subcordiformis*, в присутствии разобщителя фотофосфорилирования, СССР [95]. Увеличение выхода H_2 за счет добавления СССР в основном связано с комбинацией нескольких механизмов. СССР, как ADRY-агент, ингибировал активность КВК ФС II, что привело к заметному снижению фотовыделения кислорода, и хотя окислительное дыхание митохондрий лишь слегка инактивировалось СССР, тем не менее эффективно достигался анаэробноз на стадии фотогенерации H_2 , предотвращающий инактивацию кислородом обратимой гидрогеназы в клетках. Разобщающий эффект СССР ускорял перенос электронов из воды, нарушал $\Delta p\text{H}$ через тилакоидную мембрану и, таким образом, увеличивал доступность электронов и протонов для гидрогеназы. Электроны для фотогенерации водорода в основном поставлялись в результате фотолиза воды (90%) [95].

Использование ингибиторов, искусственных акцепторов и доноров электронов в качестве экспериментальных инструментов для изучения фотосинтетического аппарата, а также их значение в историческом развитии представлений о свойствах, функциях и последовательности переносчиков электрона в электрон-транспортной цепи фотосинтеза подробно рассмотрено в обзоре Требста [96].

Представлен подробный обзор достижений и открытий в исследованиях биохимических путей и физиологических процессов растений, сделанных благодаря использованию разных ингибиторов фотосинтеза [97]. Высокое сродство ингибиторов к соответствующим сайтам-мишеням делает их полезными экспериментальными инструментами. В качестве лишь одного из примеров их значимости указывается работа, связанная с открытием сайта связывания ингибиторов, подавляющих ФС II, награжденная Нобелевской премией в 1988 году.

Показано, что ингибиторы могут быть использованы в промышленных масштабах для увеличения выработки определенных каротиноидов клетками зеленой водоросли *Dunaliella bardawil*, способными накапливать большое количество каротина в стрессовых условиях (диурон увеличивал биосинтез лютеина в 2 раза) [98].

Показано, что существует возможность увеличения эффективности производства молекулярного водорода от 3-х до 5-ти раз клетками одноклеточной галотолерантной цианобактерии *Aphanothece halophytica*, которая является потенциальным темновым ферментативным продуцентом, если обрабатывать клетки СССР и DCMU, комбинируя условия освещения или время инкубации в темноте [99]. Одним из основных факторов, ограничивающих фотогенерацию водорода, выступает кислород, ингибитор активности двунаправленной гидрогеназы в клетках *A. halophytica*. Кислород интенсивно выделяется как побочной продукт фотосинтетической активности ФС II на свету в результате расщепления молекул воды, но может поглощаться в результате дыхания. С помощью СССР и DCMU подавляли фотосинтетическое выделение кислорода, и таким образом достигали низких уровней кислорода. Кроме того, СССР усиливал частоту дыхания, еще больше снижая уровень кислорода [99].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основная информация по химическим ингибиторам ФС II была получена в 70–80 гг. прошлого столетия. В эти годы существовала серьезная экономическая заинтересованность в разработке и исследованиях химических средств борьбы с сорняками (гербицидов). В эти годы было опубликовано большая часть информации о механизмах действия гербицидов, их участках связывания и основных эффектах на характерные реакции фотосистем и состояния интермедиатов электрон-транспортной цепи фотосинтеза. Поэтому в обзоре так много ссылок на публикации тех лет. В последующем, в связи с развитием и расширением других технологий, в том числе использующих генетически модифицированные сорта экономически значимых растений, а также с существенным повышением внимания к проблеме экологии и загрязнения сельхозугодий химическим поллютантами, исследования, направленные на выявление, разработку новых химических гербицидов стали менее актуальными и, соответственно, это отразилось на количестве научных публикаций. Однако, поскольку основные эффекты были уже достаточно широко известны больше стало публикаций об использовании этих химических агентов в качестве инструментов научных исследований, а также в качестве средств управления определенными этапами фотосинтетического процесса для производства необходимых соединений, продуктов фотосинтеза. Примером такого управления может быть применение диурона и СССР для увеличения генераций молекулярного водорода клетками одноклеточной галотолерантной цианобактерии *Aphanothece halophytica* [99]. В тоже время в современных исследованиях про-

должает появляться новая информация об эффектах, механизмах и участках действия даже известных химических ингибиторов ФС II. Выявлен новый участок преимущественного связывания диурона, диносеба, ТФБ и ADRY-агентов с новым хинон-связывающим сайтом Q_C и показано, что результатом такого связывания является сдвиг среднего потенциала E_m высокопотенциальной формы цитохрома b_{559} в сторону отрицательных величин в результате окисления гемовой группы цитохрома этими агентами [61]. В обзоре невозможно рассмотреть все публикации вследствие обоснованных ограничений в объеме текста и использованных ссылок. Поэтому авторы приносят искренние извинения читателю за то, что, возможно, некоторые, эффекты химических ингибиторов ФС II или публикации по указанной теме оказались не представлены в обзоре.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-14-50341.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hsu B.D., Lee J.Y., Pan R.L.* The two binding sites for DCMU in Photosystem II // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1986. V. 141. P. 682.
2. *Kamachi H., Tamura N., Inoue H.* Putative Second Binding Site of DCMU on the Oxidizing Side of Photosystem II in Photosystem II Membranes Depleted of Functional Mn // *Plant and Cell Physiol.* 1992. V. 33. P. 437.
3. *Klimov V.V., Shuvalov V.A., Heber U.* Photoreduction of pheophytin as a result of electron donation from the water-splitting system to Photosystem-II reaction centers // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1985. V. 809. P. 345.
4. *Klimov V.V., Allakhverdiev S.I., Ladygin V.G.* Photoreduction of pheophytin in photosystem II of the whole cells of green algae and cyanobacteria // *Photosynth. Res.* 1986. V. 10. P. 355.
5. *Климов В.В., Аллаhverдиев С.И., Жармухамедов С.К.* Окислительно-восстановительное взаимодействие фенольного гербицида диносеба с парой [П(680(+))Фф(-)] в реакционном центре фотосистемы 2 растений // *Физиология растений.* 1989. Т. 36. С. 770.
6. *Аллаhverдиев С.И., Жармухамедов С.К., Климов В.В., Васильев С.С., Корватовский Б.Н., Пащенко В.З.* Влияние диносеба и других фенольных соединений на кинетику затухания флуоресценции хлорофилла фотосистемы 2 высших растений // *Биологические мембраны.* 1989. Т. 6. С. 1147.
7. *Belatik A., Joly D., Hotchandani S., Carpentier R.* Re-evaluation of the side effects of cytochrome b6f inhibi-

- tor dibromothymoquinone on photosystem II excitation and electron transfer // *Photosynth. Res.* 2013. V. 117. P. 489.
8. *Tischer W., Strotmann H.* Relationship between inhibitor binding by chloroplasts and inhibition of photosynthetic electron transport // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1977. V. 460. P. 113.
 9. *Климов В.В., Жармухамедов С.К., Аллахвердиев С.И., Колобанова Л.П., Баскаков Ю.А.* Новые фенольные ингибиторы переноса электрона в фотосистеме 2 растений // *Биологические мембраны.* 1992. Т. 9. С. 565.
 10. *Климов В.В., Жармухамедов С.К., Аллахвердиев С.И., Колобанова Л.П., Баскаков Ю.А.* Новая группа ингибиторов переноса электрона в фотосистеме 2 растений. I. Химическая структура и эффективность ингибирования // *Биологические мембраны.* 1993. Т. 10. С. 565.
 11. *Киселев Б.А., Супонева Е.Н., Жармухамедов С.К., Климов В.В., Колобанова Л.П., Баскаков Ю.А.* Новая группа ингибиторов переноса электрона в фотосистеме 2 растений. II. Окислительно-восстановительные свойства производных перфторизопротопидинитробензола и их связь с эффективностью ингибирования // *Биологические мембраны.* 1993. Т. 10. С. 571.
 12. *Klimov V.V., Zharmukhamedov S.K., De-Las-Rivas J., Barber J.* Effect of Photosystem II inhibitor K-15 on photochemical reactions of the isolated D1/D2 cytochrome b559 complex // *Photosynth. Res.* 1995. V. 44. P. 67.
 13. *Allakhverdiev S.I., Klimov V.V., Carpentier R.* Evidence for the involvement of cyclic electron transport in the protection of photosystem II against photoinhibition: influence of a new phenolic compound // *Biochemistry.* 1997. V. 36. P. 4149.
 14. *Pobeguts O.V., Smolova T.N., Zharmukhamedov S.K., Klimov V.V.* Predominant Protection of D2-Protein against Photodestruction in Isolated D1/D2/Cytochrome b559 by K15, a Phenolic-Type Inhibitor of Electron Transfer in Photosystem 2 // *Biochemistry (Moscow).* 2004. V. 69. P. 612.
 15. *Zharmukhamedov S.K., Kristin M.S., Li S., Allakhverdiev S.I., Klimov V.V.* Binding of novel inhibitors of electron transfer in photosystem 2, derivatives of perfluoroisopropylidinitrobenzene, with polypeptide D2 of the reaction center // *Biochemistry (Moscow).* 2003. V. 68. P. 162.
 16. *Жармухамедов С.К., Климов В.В., Аллахвердиев С.И.* Отсутствие конкуренции за место связывания между диуроном и новыми ингибиторами переноса электрона в фотосистеме 2 – производными перфторизопротопидинитробензола // *Биохимия.* 1995. Т. 60. С. 962.
 17. *Karacan M.S., Zharmukhamedov S.K., Mamas S., Kupriyanova E.V., Shitov A.V., Klimov V.V., Ozbek N., Ozmen U., Gunduzalp A., Schmitt F.-J., Karacan N., Friedrich T., Los D.A., Carpentier R., Allakhverdiev S.I.* Screening of novel chemical compounds as possible inhibitors of carbonic anhydrase and photosynthetic activity of photosystem II // *J. Photochem. Photobiol., B.* 2014. V. 137. P. 156.
 18. *Karacan M.S., Rodionova M.V., Tunç T., Venedik K.B., Mamas S., Shitov A.V., Zharmukhamedov S.K., Klimov V.V., Karacan N., Allakhverdiev S.I.* Characterization of nineteen antimony(III) complexes as potent inhibitors of photosystem II, carbonic anhydrase, and glutathione reductase // *Photosynth. Res.* 2016. V. 130. P. 167.
 19. *Rodionova M.V., Zharmukhamedov S.K., Karacan M.S., Venedik K.B., Shitov A.V., Tunc T., Mamas S., Kreslavski V.D., Karacan N., Klimov V.V., Allakhverdiev S.I.* Evaluation of new Cu(II) complexes as a novel class of inhibitors against plant carbonic anhydrase, glutathione reductase and photosynthetic activity in photosystem II // *Photosynth. Res.* 2017. V. 133. P. 139.
 20. *Izawa S., Good N.E.* Inhibition of photosynthetic electron transport and photophosphorylation // *Methods in Enzymol.* 1972. V. 24. P. 355.
 21. *Velthuys B.R., Amesz J.* Charge accumulation at the reducing side of system II of photosynthesis // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1974. V. 333. P. 85.
 22. *Van Assche C.J., Carles P.M.* Photosystem II inhibitors chemicals: Molecular interaction between inhibitors and a common target // *Biological responses induced by herbicides / Eds. Moreland D.E., St. John J.B., Hess. F.D.* Washington, USA: American Chemical Society, 1982. V. 181. P. 1.
 23. *Wraight C.A.* Oxidation-Reduction Physical Chemistry of the Acceptor Quinone Complex in Bacterial Photosynthetic Reaction Centers: Evidence for a New Model of Herbicide Activity // *Israel Journal of Chemistry.* 1981. V. 21. P. 348.
 24. *Velthuys B.R.* Electron-dependent completion between plastoquinone and inhibitors for binding to photosystem II // *FEBS Lett.* 1981. V. 126. P. 277.
 25. *Vermaas W.F.J., Renger G., Arntzen C.J.* Herbicide/Quinone Binding Interactions in Photosystem II // *Z. Naturforsch.* 1984. V. 39c. P. 368.
 26. *Vermaas W.F.J., Dohnt G., Renger G.* Binding and release kinetics of inhibitors of Q_A^- oxidation in thylakoid membranes // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1984. V. 765. P. 74.
 27. *Robinson H.H., Cofis A.R.* Kinetics of the oxidation-reduction reactions of the photosystem II quinone acceptor complex, and the pathway for deactivation // *FEBS Lett.* 1983. V. 153. P. 221.
 28. *Urbach W., Laasch H., Schreiber U.* Redox-State Dependent Changes of Inhibitor-Binding to the Photosystem II Acceptor Complex // *Z. Naturforsch.* 1984. V. 39c. P. 397.
 29. *Crofts A.R., Wraight C.A.* The electrochemical domain of photosynthesis // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1983. V. 726. P. 149.
 30. *Laasch H., Pfister K., Urbach W.* High- and low-affinity binding of photosystem II herbicides to isolated thylakoid membranes and intact algal cells // *Z. Naturforsch.* 1982. V. 37. P. 620.
 31. *Jursinic P., Stemler A.* Changes in [14C] Atrazine Binding Associated with the Oxidation-Reduction State of the Secondary Quinone Acceptor of Photosystem II // *Plant Physiol.* 1983. V. 73. P. 703.
 32. *Vermaas W.F.J., Arntzen C.J.* Synthetic quinones influencing herbicide binding and Photosystem II electron transport; the effect of atrazine resistance on quinone-

- binding properties in thylakoid membranes // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1983. V. 725. P. 483.
33. *Oettmeier W., Masson K., Soil H.-J., Draber W.* Herbicide Binding at Photosystem II: A New Azido-triazinone Photoaffinity Label // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1984. V. 767. P. 590.
 34. *Ort D.R., Ahrens W.H., Martin B., Stoller E.W.* Comparison of Photosynthetic Performance in Triazine-Resistant and Susceptible Biotypes of *Amaranthushybridus* // *Plant Physiol.* 1983. V. 72. P. 925.
 35. *Васильев И.Р., Ли Д.И., Маторин Д.Н., Венедиктов П.С.* Множественность мест действия гербицидов, ингибирующих фотосистему 2 зеленых растений // *Физиология растений.* 1988. Т. 35. С. 694.
 36. *Purcell M., Leroux G.D., Carpentier R.* Atrazine action on the donor side of photosystem II in triazine-resistant and -susceptible weed biotypes // *Pestic. Biochem. Physiol.* 1990. V. 37. P. 83.
 37. *Carpentier R., Fuerst P.E., Nakatani H.Y., Arntzen C.J.* A second site for herbicide action in photosystem II // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1985. V. 808. P. 293.
 38. *Renger G.* The action of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea on the water-splitting enzyme system Y of photosynthesis // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1973. V. 314. P. 113.
 39. *Horton P., Whitmarsh J., Cramer W.A.* On the specific site of action of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea in chloroplasts: inhibition of a dark acid-induced decrease in midpoint potential of cytochrome b-559 // *Arch. Biochem. Biophys.* 1976. V. 176. P. 519.
 40. *Toth S.Z., Schansker G., Strasser R.J.* In intact leaves, the maximum fluorescence level (FM) is independent of the redox state of the plastoquinone pool: A DCMU-inhibition study // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 2005. V. 1708. P. 275.
 41. *Broser M., Glockner C., Gabdulkhakov A., Guskov A., Buchta J., Kern J., Muh F., Dau H., Saenger W., Zouni A.* Structural Basis of Cyanobacterial Photosystem II Inhibition by the Herbicide Terbutryn // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 15964.
 42. *Trebst A., Draber W.* Structure activity correlations of recent herbicides in photosynthetic reactions // *Advances in Pesticide Chemistry* / Eds. Geissbuhler H., Kearner P.C., Brooks G.T. Oxford, UK: Pergamon, 1979. P. 223.
 43. *Гольдфельд М.Г., Каранетян Н.В.* Фотосинтез и гербициды // *Журнал Всесоюзного химического общества им. Д.И. Менделеева.* 1986. Т. 31. С. 567.
 44. *Гольдфельд М.Г., Каранетян Н.В.* Физико-химические основы действия гербицидов // *Итоги науки и техники. Серия Биологическая химия.* 1989. Т. 30. С. 145
 45. *Pfister K., Schreiber U.* Comparison of diuron- and phenol-type inhibitors: additional inhibitory action at the photosystem-II donor site. *Z. Naturforsch.* 1984. V. 39c. P. 389.
 46. *Wollman F.A.* Determination and modification of the redox state of the secondary acceptor of photosystem II in the dark // *Biochem. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1978. V. 503. P. 263.
 47. *Farineau J., Mathis P.* Effects of herbicides on binary oscillations of ultraviolet flash-induced absorption changes in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1985. V. 808. P. 103.
 48. *Rutherford A.W., Zimmerman J.L., Mathis P.* The effect of herbicides on components of the PS II reaction centre measured by EPR // *FEBS Lett.* 1984. V. 165. P. 156.
 49. *Horvath H., Trebst A.* Usefulness of thermoluminescence in herbicide research. *Crit. Rev. Plant Sci.* 1986. V. 4. P. 293.
 50. *Babcock G.T., Sauer K.* Electron paramagnetic resonance signal II in spinach chloroplasts. II. Alternative spectral forms and inhibitor effects on kinetics of signal II in flashing light // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1973. V. 325. P. 504.
 51. *Mathis P., Rutherford A.W.* Effects of phenolic herbicides on the oxygen-evolving side of photosystem-II. Formation of carotenoid cation // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1984. V. 767. P. 217.
 52. *Renger G.* The action of 2-anilinothiophenes as accelerators of the deactivation reactions in the watersplitting enzyme system of photosynthesis // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1972. V. 256. P. 428.
 53. *Schenck C.C., Diner B., Mathis P., Satoh K.* Flash-induced carotenoid radical cation formation in Photosystem II // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1982. V. 680. P. 216.
 54. *Hertogs M., Wessels J.S.* Ferredoxin-stimulated photoreduction of 2,4-dinitrophenol with solubilized chlorophyll a // *Biochim. Biophys. Acta, Biophys. Incl. Photosynth.* 1965. V. 109. P. 610.
 55. *Барский Е.Л., Губанова О.Н., Самуилов В.Д.* Ингибирующее действие 2,6-дитретбутил-4-метилфенола на перенос электронов в фотосистеме-II изолированных мембран // *Биохимия.* 1988. Т. 53. С. 2025.
 56. *Аллахвердиев С.И., Музафаров Е.Н., Климов В.В.* Влияние кварцетина на перенос электронов в фотосистеме 1 и 2 хлоропластов гороха // *Биофизика.* 1989. Т. 34. С. 976.
 57. *Климов В.В., Аллахвердиев С.И., Жармухамедов С.К.* Окислительно-восстановительное взаимодействие фенольного гербицида диносеба с парой [П(680(+))Фф(-)] в реакционном центре фотосистемы 2 растений // *Физиология растений.* 1989. Т. 36. С. 770.
 58. *Horvath H., Trebst A.* Usefulness of thermoluminescence in herbicide research. *Crit. Rev. Plant Sci.* 1986. V. 4. P. 293.
 59. *Krieger-Liszka A., Rutherford A.W.* Influence of herbicide binding on the redox potential of the quinone acceptor in photosystem II: relevance to photodamage and phytotoxicity // *Biochemistry.* 1998. V. 37. P. 17339.
 60. *Roberts A.G., Gregor W., Britt R.D., Kramer D.M.* Acceptor and donor-side interactions of phenolic inhibitors in Photosystem II // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 2003. V. 1604. P. 23.
 61. *Kaminskaya O., Shuvalov V.A., Renger G.* Two reaction pathways for transformation of high potential cytochrome b559 of PS II into the intermediate potential

- form // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 2007. V. 1767. P. 550.
62. *Yotsova E.K., Stefanov M.A., Dobrikova A.G., Apostolova E.L.* Different sensitivities of photosystem II in green algae and cyanobacteria to phenylurea and phenol-type herbicides: effect on electron donor side // *Z. Naturforsch.* 2017. V. 72c. P. 315.
63. *Rutherford A.W., Krieger-Liszkay A.* Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II // *Trends Biochem. Sci.* 2001. V. 26. P. 648.
64. *Fufezana C., Rutherford A.W., Krieger-Liszkaya A.* Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II // *FEBS Lett.* 2002. V. 532. P. 407.
65. *Takahashi R., Hasegawa K., Takano A., Noguchi T.* Structures and Binding Sites of Phenolic Herbicides in the Q_B Pocket of Photosystem II // *Biochemistry.* 2010. V. 49. P. 5445.
66. *Renger G., Bouges-Bocquet B., Buchel K.H.* The modification of the trapping properties within the photosynthetic watersplitting enzyme system Y // *J. Bioenergetics.* 1973. V. 4. P. 491.
67. *Renger G., Bouges-Bocquet B., Delosme R.* Studies on the ADRY agent-induced mechanism of the discharge of the holes trapped in the photosynthetic watersplitting enzyme system Y // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1973. V. 292. P. 796.
68. *Renger G., Inoue Y.* Studies on the mechanism of ADRY agents (agent accelerating the deactivation reactions of water-splitting enzyme system Y) on thermoluminescence emission // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1983. V. 725. P. 146.
69. *Renger G.* Studies on the mechanism of destabilization of the positive charges trapped in the photosynthetic water-splitting enzyme system Y by a deactivation-accelerating agent // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1973. V. 314. P. 390.
70. *Renger G.* Requirement of an acidic proton in substances which act as accelerators of the deactivation reactions in the water-splitting enzyme system of photosynthesis // *FEBS Lett.* 1972. V. 23. P. 321.
71. *Katoh S., San Pietro A.* Ascorbate-supported NADP photoreduction by heated Euglena chloroplasts // *Arch. Biochem. Biophys.* 1967. V. 122. P. 144.
72. *Homann P.H.* Actions of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone on electron transport and fluorescence of isolated chloroplasts // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1971. V. 245. P. 129.
73. *Yamashita T., Butler W.L.* Inhibition of the Hill reaction by Tris and restoration by electron donation to photosystem II // *Plant Physiol.* 1969. V. 44. P. 1342.
74. *Kimimura M., Katoh S., Ikegami I., Takamiya A.* Inhibitory site of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone in the electron transfer system of the chloroplasts // *Biochim. et Biophys. Acta, Bioenerg.* 1971. V. 234. P. 92.
75. *Homann P.H.* Actions of tetraphenylboron on the electron flow in photosystem II of isolated chloroplasts // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1972. V. 256. P. 336.
76. *Gregory R.P.* The inhibition of oxygen production and the uncoupling of electron transport in photosynthesis in chloroplasts by substituted thiophens // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1974. V. 368. P. 228.
77. *Lemasson C., Etienne A.L.* Photo-inactivation of system II centers by carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone in *Chlorella pyrenoidosa* // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1975. V. 408. P. 135.
78. *Siderer Y., Hardt H., Malkin S.* Effect of uncouplers and ADRY reagents on delayed and triggered emission from isolated chloroplasts // *FEBS Lett.* 1976. V. 69. P. 19.
79. *Lozier R.H., Butler W.L.* Effects of Photosystem II Inhibitors on Electron Paramagnetic Resonance Signal II of Spinach Chloroplasts // *Photochem. Photobiol.* 1973. V. 17. P. 133.
80. *Cramer W.A., Horton P., Donnell J.J.* Inhibition of chemical oxidation and reduction of cytochromes f and b-559 by carbonyl cyanide p-trifluoromethoxy phenylhydrazone // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1974. V. 368. P. 361.
81. *Velthuys B.R.* Carotenoid and cytochrome b559 reactions in photosystem II in the presence of tetraphenylboron // *FEBS Lett.* 1981. V. 126. P. 272.
82. *Mac Laughlin S.G.A., Dilger J.P.* Transport of protons across membranes by weak acids // *Physiol. Rev.* 1980. V. 60. P. 825.
83. *Hanssum B., Renger G., Weiss W.* Studies on the reaction mechanism of tetraphenylboron at the Photosystem II donor side in isolated spinach chloroplasts // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1985. V. 808. P. 243.
84. *Barber J., Chapman D.J., Telfer A.* Characterisation of a PS II reaction centre isolated from the chloroplasts of *Pisum sativum* // *FEBS Lett.* 1987. V. 220. P. 67.
85. *Barabas K., Garab G.* Two populations of the high-potential form of cytochrome b-559 in chloroplasts treated with 2-(3-chloro-4-trifluoromethyl)anilino-3,5-dinitrothiophene (Ant 2p) // *FEBS Lett.* 1989. V. 248. P. 62.
86. *Козлов Ю.Н., Казакова А.А., Фейзиуев Я.М., Аллахвердиев С.И., Климов В.В.* Электрохимическое окисление и восстановление АНТ-2р в связи с его ингибирующим действием на активность фотосистемы 2 // *Биохимия.* 1995. Т. 60. С. 976.
87. *Samuilov V.D., Renger G., Paschenko V.Z., Oleskin A.V., Gusev M.V., Gubanov O.N., Vasil'ev S.S., Barsky E.L.* Inhibition of photosynthetic oxygen evolution by protonophoric uncouplers // *Photosynth. Res.* 1995. V. 46. P. 455.
88. *Bukhov N.G., Egorova E.A., Govindachary S., Carpentier R.* Changes in polyphasic chlorophyll a fluorescence induction curve upon inhibition of donor or acceptor side of photosystem II in isolated thylakoids // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 2004. V. 1657. P. 121.
89. *Karacan M., Yakana C., Yakan M., Karacan N., Zhar-mukhamedov S.K., Shitov A., Los D.A., Klimov V.V., Allahverdiev S.I.* Quantitative structure-activity relationship analysis of perfluoroisopropyl dinitrobenzene derivatives known as photosystem II electron transfer inhibitors // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 2012. V. 1817. P. 1229.
90. *Satoh K., Nakatani H.Y., Steinback K.E., Wiltson J., Arntzen C.I.* Polypeptide composition of a photosystem II core complex presence of a herbicide-binding protein // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1983. V. 724. P. 142.
91. *Marder J.B., Chapman D.J., Telfer A., Nixon P.J., Barber J.* Identification of psbA and psbD gene products, D1

- and D2, as reaction centre proteins of photosystem 2 // Plant Mol. Biol. 1987. V. 9. P. 325.
92. Шитов А.В., Побегуц О.В., Смолова Т.Н., Аллахвердиев С.И., Климов В.В. Марганецзависимая карбоангидразная активность белков фотосистемы 2 // Биохимия. 2009. Т. 74. С. 629.
93. Shitov A.V., Zharmukhamedov S.K., Shutova T.V., Allakhverdiev S.I., Samuelsson G., Klimov V.V. A carbonic anhydrase inhibitor induces bicarbonate-reversible suppression of electron transfer in pea photosystem 2 membrane fragments // J. Photochem. Photobiol., B. 2011. V. 104. P. 366.
94. Shitov A.V., Terentyev V.V., Zharmukhamedov S.K., Rodionova M.V., Karacan M., Karacan N., Klimov V.V., Allakhverdiev S.I. Is carbonic anhydrase activity of photosystem II required for its maximum electron transport rate? // Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. 2018. V. 1859. P. 292.
95. Ran C., Yu X., Jin M., Zhang W. Role of Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone in enhancing photobiological hydrogen production by marine green alga *Platymonas subcordiformis* // Biotechnol. Prog. 2006. V. 22. P. 438.
96. Trebst A. Inhibitors in the functional dissection of the photosynthetic electron transport system // Photosynth. Res. 2007. V. 92. P. 217.
97. Dayan F.E., Duke S.O., Grossmann K. Herbicides as Probes in Plant Biology // Weed Sci. 2010. V. 58. P. 340.
98. Doddaiah K.M., Narayan A., Aswathanarayana R.G., Ravi S. Effect of metabolic inhibitors on growth and carotenoid production in *Dunaliella bardawil* // J. Food Sci. Technol. 2013. V. 50. P. 1130.
99. Pansook S., Incharoensakdi A., Phunpruch S. Effects of the photosystem II inhibitors CCCP and DCMU on hydrogen production by the unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* // Scientific World J. 2019. V. 2019: 1030236. <https://doi.org/10.1155/2019/1030236>