

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

**Плюснина Татьяна Юрьевна**

**Динамическая организация переходных процессов в клетках  
фотосинтезирующих организмов в норме и под действием стресса**

Специальность 1.5.8. Математическая биология, биоинформатика

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора физико-математических наук

Москва – 2026

Диссертация подготовлена на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

**Научные  
консультанты:**

*Рубин Андрей Борисович,  
доктор биологических наук, профессор, академик РАН;*

*Ризниченко Галина Юрьевна,  
доктор физико-математических наук, профессор.*

**Официальные  
оппоненты:**

*Тихонов Александр Николаевич,  
доктор физико-математических наук, профессор,  
Московский государственный университет  
имени М.В. Ломоносова, физический факультет,  
профессор кафедры биофизики;*

*Малинецкий Георгий Геннадьевич,  
доктор физико-математических наук, профессор,  
Федеральный исследовательский центр «Институт  
прикладной математики им. М.В. Келдыша Российской  
академии наук», заведующий отделом Математического  
моделирования нелинейных процессов;*

*Гурия Георгий Теодорович,  
доктор физико-математических наук, профессор,  
Московский физико-технический институт  
(национальный исследовательский университет), Физтех-  
школа биологической и медицинской физики, профессор  
кафедры физики живых систем.*

Защита диссертации состоится 19 ноября 2026 г. в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.5 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские Горы д. 1, стр. 24, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, аудитория «Новая».

E-mail: fursova@biophys.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3961>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2026 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат физико-математических наук

П.В. Фурсова

# **I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

## **Актуальность темы исследования**

В современных подходах наук о жизни, биофизики и системной биологии, все более укрепляется мнение, что для глубокого понимания жизнедеятельности клетки необходим анализ ее динамической организации, исследование неравновесных режимов, которые могут определять как ее функциональную устойчивость, так и адаптацию к изменению внешних условий. Для фотосинтезирующих организмов, составляющих основу биосферы и являющихся первичными продуцентами, изучение динамики процессов особенно актуально. Их жизнедеятельность напрямую зависит от внешних, постоянно изменяющихся факторов, таких как освещенность, температура, доступность воды и минеральных элементов. В отличие от животных, способных к активной миграции или терморегуляции, растения и водоросли вынуждены адаптироваться к меняющимся условиям непосредственно в своей среде обитания, в результате чего их выживание и продуктивность в значительной степени зависит от того, как организованы их процессы адаптации. Такие процессы могут выражаться как в медленных, так и в быстрых перестройках клеточных физиологических режимов в ответ на изменение условий внешней среды. Для описания быстрых перестроек все чаще используется термин «переходный процесс», заимствованный из теории динамических систем и технических дисциплин.

Переходный процесс в живых организмах можно определить как системный ответ клетки на внешнее воздействие, при котором за короткий период времени меняется ее функциональное состояние при переходе к новому стационарному режиму. Такой процесс направлен на перестройку клеточных функций и может охватывать разные иерархические уровни: биохимический, физиологический, популяционный и другие.

Иерархическая организация клетки проявляется как на структурном, так и на временном уровнях. На структурном уровне – это взаимодействие компонентов разных масштабов, от молекулярных комплексов (фотосистемы,

светособирающие антенны, пигменты) до субклеточных органелл (хлоропласты, тилакоидные мембраны), клеток и тканей. В динамическом отношении – это процессы, охватывающие диапазон времен от пикосекунд (поглощение квантов света фотосинтетическими антеннами), микросекунд (окислительно-восстановительные реакции в фотосистеме II) до минут, часов и дней (изменение белкового состава фотосинтетического аппарата, метаболические перестройки).

Для осуществления быстрых ответов клетке необходимы механизмы, не зависящие напрямую от генетического контроля, поскольку последний требует больших временных затрат, чем необходимо для быстрого ответа. Теория динамических систем, к которым относятся и все живые организмы, предлагает инструментарий для выявления таких механизмов. Существование нелинейных переходных режимов в сложной системе отражает ее способность к саморегуляции, обеспечивает сохранение функций за счет направленных динамических перестроек. Присущая биологическим системам нелинейная организация, наличие положительных обратных связей и мультистационарность, обуславливают их способность к быстрым переключениям (бифуркациям) в ответ на внешнее воздействие. Такие режимы могут проявляться, в частности, в виде резких пороговых переходов к новому стационарному состоянию (например, падения активности фотосинтетического аппарата в *Chlamydomonas reinhardtii* при серном голодании) или инициации автоколебаний (например, колебаний мембранного потенциала в клетках *Chara corallina* при изменении световых условий). Нелинейная динамика переходных процессов сама по себе может служить индикатором начала адаптации еще до появления видимых физиологических или морфологических изменений. Исследование характера такой динамики может дать понимание, как активируется тот или иной регуляторный путь, какие параметры процессов оказываются наиболее чувствительными и могут стать мишенями для внешнего воздействия.

Актуальность работы определяется необходимостью формирования интегративного подхода для понимания динамических особенностей клеточной адаптации, что достижимо лишь при совместном рассмотрении неравновесных

стационарных режимов и переходных процессов. Предлагаемый в работе подход состоит в объединении экспериментальных данных, отражающих динамику переходных процессов на разных уровнях организации клетки, с их количественным анализом на основе математических моделей с иерархической структурой и применением методов нелинейной динамики. Такой подход делает возможным количественную диагностику стрессовых состояний на ранних этапах их возникновения и создает основу управления адаптационными реакциями.

### **Степень разработанности темы исследования**

В настоящее время кинетические механизмы переходных процессов как функционально значимых этапов клеточной адаптации к стрессу остаются недостаточно изученными. Классические концепции, такие как закон минимума Либиха (принцип узкого места), подчеркивают роль лимитирующего фактора в росте и продуктивности, но не учитывают динамическую организацию живых систем. При действии стресса «узкое место» может смещаться, затрагивая несколько взаимосвязанных подсистем, вызывая нелинейные, многофазные ответы. В таких условиях адаптация проявляется не как плавная и постепенная перестройка системы, а как последовательность бифуркаций, резких переходов между ее устойчивыми функциональными состояниями.

Фотосинтетический аппарат растительных организмов представляет собой уникальную модельную систему. Ее ценность заключается как в наличии обширных знаний о механизмах фотосинтеза, так и в доступности прямых экспериментальных данных о динамике переходных процессов, возникающих в ответ на внешние воздействия. Накоплен огромный массив данных, включающий как значения кинетических констант элементарных реакций, так и особенности динамики физиологических ответов на уровне целостной клетки.

Хотя отдельные аспекты функционирования фотосинтезирующей клетки хорошо изучены, переходные процессы как функционально значимые этапы адаптации на разных иерархических уровнях остаются недостаточно исследованными. В представленной работе предлагается методология, которая

объединяет данные от первичных фотохимических стадий до процессов темнового метаболизма в единую динамическую модель адаптации. Тем самым становится возможным проводить интегративный анализ, последовательно связывая процессы на разных иерархических уровнях и выявлять управляющие параметры переходных процессов.

### **Цели и задачи исследования**

Целью настоящей работы является формирование концепции переходных процессов как регуляторных фаз адаптации фотосинтезирующей клетки и выявление механизмов, обуславливающих пороговые эффекты на разных иерархических уровнях организации фотосинтезирующей клетки.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать математические модели, охватывающие разные иерархические уровни организации фотосинтезирующих клеток, включая макромолекулярные комплексы фотосинтетического аппарата, мембранные процессы, клеточный рост, и воспроизводящие экспериментально наблюдаемую динамику как в нормальных, так и в стрессовых условиях.
2. На основе мультиэкспоненциальной аппроксимации кривых индукции флуоресценции хлорофилла *a* разработать математический метод анализа фаз экспериментальных кривых индукции флуоресценции (СМЭА) как основного источника информации о динамических перестройках фотосинтетического аппарата клеток зеленых водорослей.
3. Выявить компоненты индукционных кривых, соответствующие различным функциональным состояниям фотосистемы II, на основе анализа массива экспериментальных кривых индукции флуоресценции, полученных на культурах водорослей (модельных биологических объектах) в разных условиях освещения и при действии разных факторов стресса (дефицит азота, фосфора, серы, отравление токсикантами), используя редуцированные модели фотосистемы II и разработанный метод (СМЭА).
4. С помощью разработанных нелинейных математических моделей, объединяющих разные иерархические уровни фотосинтезирующей клетки

(фотоиндуцированные реакции в хлоропластах, процессы на клеточных мембранах, метаболические пути, рост клеточной популяции), провести анализ переходных процессов, включающих бистабильные переключения, гистерезис, колебания, выявить управляющие параметры таких процессов.

5. На основе анализа нелинейных режимов разработанных моделей предложить возможные механизмы переключения между функциональными состояниями фотосинтезирующей клетки.

### **Научная новизна исследования**

Научная новизна диссертационной работы заключается в следующем:

1. Разработанный системный иерархический подход к анализу переходных процессов позволяет описывать динамику адаптации клетки на разных пространственно-временных масштабах, от первичных фотохимических реакций до метаболической перестройки клетки. Таким путем возможно выделить иерархические уровни в сложной системе и установить связи между ними. При анализе ответа целостной системы полученные в модели эффективные параметры можно «развернуть» и восстановить значения элементарных констант реакций, в том числе и недоступных для прямого измерения *in vivo*.
2. В отличие от традиционных моделей фотосистемы II, использующих усредненные кинетические параметры, предложенная модель фотосистемы II включает четыре разных типа реакционных центров, отличающихся размером светособирающей антенны и активностью кислород-выделяющего комплекса. Это позволяет количественно охарактеризовать гетерогенность реакционных центров фотосистемы II в норме и при стрессе.
3. Предложенный метод спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации (СМЭА), примененный для анализа массива кривых индукции флуоресценции, позволяет выявить визуально не обнаруживаемые особенности кривых, возникающие в условиях стресса, и тем самым обеспечивает количественную основу для ранней диагностики стрессовых состояний.

## **Теоретическая и практическая значимость**

### **Теоретическая значимость**

Предложена концепция переходного процесса как значимого элемента адаптации клетки к изменению условий. Обоснован иерархический подход, позволяющий выявить взаимосвязь быстрых фотохимических процессов (миллисекунды) с медленными метаболическими перестройками (часы), а также определить ключевые факторы, влияющие на переключение динамических режимов.

Разработана концепция «редукции с разворачиванием», которая позволяет получить относительно простые модели для анализа экспериментальных данных. Такой подход упрощает решение обратной задачи в кинетическом моделировании, ограничивая пространство определяемых параметров. Связь в явном виде эффективных параметров модели с элементарными константами позволяет интерпретировать результаты моделирования с учетом механизмов элементарных реакций.

На основе выявленных переходных процессов в клетках *Chlamydomonas*, *Chlorella* и *Chara* (автоколебания, гистерезис, триггерные переключения) сформировано представление о клеточной адаптации к внешнему воздействию как о направленном динамическом процессе, что позволяет рассматривать переходные процессы в качестве индикаторов клеточного ответа на изменение внешних условий и обосновывать стратегии управления функциональными состояниями клетки.

### **Практическая значимость**

1. *Ранняя диагностика стресса по кривым флуоресценции хлорофилла а.* Метод СМЭА позволяет количественно анализировать экспериментальные кривые и выявлять стресс на ранних стадиях до видимых повреждений. Редуцированная модель фотосистемы II дает возможность оценить изменение гетерогенности реакционных центров как маркера действия стресса и прогнозировать реакцию фотосинтезирующих организмов на изменение условий (дефицит питательных веществ, действие токсикантов).

Эти методы могут быть внедрены в системы автоматизированного контроля культивирования водорослей.

2. *Оптимизация биотехнологических процессов.* Предложена стратегия культивирования *Chlorella vulgaris*, направленная на максимизацию накопления полифосфатов, являющихся ценным продуктом для производства удобрений. Понимание механизмов переходных процессов в *Chlamydomonas reinhardtii* в условиях серного голодания позволяет разрабатывать стратегии для целенаправленного накопления биотоплива (водорода).
3. *Управление адаптацией.* Выявление параметров, указывающих на близость системы к точке бифуркации (порогу переключения), может использоваться для «запуска» целевого метаболического процесса путем кратковременного воздействия стрессовым фактором с последующей стабильной работой системы в новом состоянии.
4. *Создание биомаркеров.* Комбинация простых экспериментальных методов (регистрация флуоресценции) с математическим анализом (СМЭА, ЛР-тест, редуцированные математические модели) позволяет создавать доступные и надежные биомаркеры состояния окружающей среды.

## **Методология и методы исследования**

Методологической основой диссертационного исследования является системный подход, сочетающий экспериментальное наблюдение, анализ динамики и математическое моделирование.

Основные методы исследования включают:

1. *Экспериментальные методы.* Регистрация кривых индукции флуоресценции хлорофилла *a* (ОЛР-кривые) с высоким временным разрешением (от микросекунд до секунд) для анализа состояния фотосистемы II.
2. *Анализ массива экспериментальных кривых индукции флуоресценции хлорофилла *a* с применением комплекса методов, встроенных в программный пакет *pyPhotoSyn*.* Программный пакет *pyPhotoSyn* включает метод СМЭА для выделения характерных временных компонентов, ЛР-тест для оценки феноменологических параметров фотосинтетического аппарата, построение

разностных кривых для выявления специфических изменений под действием факторов стресса, построение теплокарт для одновременного анализа большого количества кривых и др. Этот подход позволяет автоматизировать обработку данных и выявлять паттерны переходных процессов в различных условиях.

3. *Математическое моделирование.* Построение и анализ кинетических моделей, основанных на системах дифференциальных уравнений. Применение как детальных моделей, описывающих множество состояний реакционного центра, так и упрощенных моделей, описывающих макроскопическую динамику. Использование метода разделения временных масштабов (теорема Тихонова) для редукции моделей и последующего «разворачивания» эффективных параметров для выяснения молекулярных механизмов.
4. *Методы анализа динамических систем.* Анализ нелинейной динамики для выявления режимов бистабильности, автоколебаний и гистерезиса. Решение обратных задач – определение параметров модели по экспериментальным данным с целью диагностики состояния системы.
5. *Интегративный подход.* Объединение данных с разных уровней организации (молекулярный, субклеточный, клеточный, популяционный), полученных экспериментально и с помощью моделей, в целостную динамическую систему.

Таким образом, методология работы позволяет анализировать поведение системы в условиях стресса, что позволяет выявлять причинно-следственные связи на нескольких пространственно-временных масштабах и прогнозировать адаптационные реакции.

### **Положения, выносимые на защиту**

На защиту выносятся следующие положения:

1. В фотосинтезирующих клетках реализуются иерархия переходных процессов. Математическое моделирование таких процессов позволяет выявить взаимосвязь разных иерархических уровней: фотоиндуцированных

реакций в комплексах фотосинтетического аппарата, процессов переноса ионов через клеточные мембраны, перестройки метаболических путей, особенностей динамики роста клеточной популяции.

2. Существование различных временных диапазонов процессов в фотосинтетическом аппарате позволяет обосновать и провести редукцию сложной многомерной модели переходов между состояниями фотосистемы II и получить модель, включающую небольшое количество ключевых переменных. Решения такой модели можно использовать для интерпретации особенностей кинетики экспериментально регистрируемой кривой индукции флуоресценции. Эффективные параметры редуцированной модели остаются связанными с элементарными константами исходной детальной модели через аналитические выражения, что обеспечивает возможность оценки элементарных констант и интерпретации соответствующих элементарных реакций.
3. Анализ массивов экспериментальных кривых индукции флуоресценции методом спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации (СМЭА) выявляет динамику характерных фаз кривых, отражающих изменения функционального состояния фотосистемы II, что позволяет рассматривать метод СМЭА как инструмент ранней диагностики действия факторов стресса.
4. Индуцированные стрессом переходы между различными функциональными состояниями фотосинтезирующей клетки представляют собой нелинейные динамические режимы, обусловленные наличием положительных обратных связей и пороговых механизмов регуляции.
5. Достижение критического значения управляющего параметра на одном иерархическом уровне способно вызывать пороговые переключения на других иерархических уровнях, такие как изменения функционального состояния фотосинтетического аппарата, перенаправление метаболических потоков или изменение динамики роста клеточной популяции. Такие

переключения могут рассматриваться как этапы адаптации фотосинтезирующих клеток к стрессу.

**Личный вклад автора** отражен во всех ключевых результатах диссертации и положениях, выносимых на защиту. Все концептуальные подходы, включая идею иерархической организации переходных процессов, методологию редукции моделей и интерпретацию бифуркационных переключений, предложены и обоснованы автором (публикации: 1, 2, 4, 5, 8, 9, 13, 15, 17, 19-24, 27). Все математические модели разработаны им самостоятельно (публикации: 5, 8, 13, 15, 17, 20-23); аналитические исследования (редукция по теореме Тихонова, анализ устойчивости, выявление точек бифуркации) выполнены лично автором (публикации: 5, 8, 13, 15, 17, 20-23). Численное моделирование и идентификация параметров по экспериментальным кривым проводились совместно со студентами и аспирантами, работающими под его руководством (публикации: 1, 2, 4, 5, 8, 9, 11-15, 17-25). Автор непосредственно участвовал в получении экспериментальных данных по индукции флуоресценции хлорофилла *a* (в частности, при азотном голодании) (публикации: 2, 8); остальные экспериментальные данные предоставлены сотрудниками кафедры биофизики биологического факультета МГУ или заимствованы из литературы. Метод спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации (СМЭА) и архитектура программного комплекса *pyPhotoSyn* разработаны совместно с Хрущёвым С. С., (публикации: 12, 14) который осуществил их программную реализацию.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных результатов подтверждена многократной верификацией моделей на независимых экспериментальных выборках, согласованностью выводов, а также воспроизводимостью ключевых динамических эффектов в повторных сериях экспериментов. Материалы диссертации были многократно представлены на научных семинарах кафедры биофизики биологического факультета МГУ, а также на конференциях, конгрессах и симпозиумах, список которых приводится ниже.

Всероссийская научная конференция с международным участием «Растения в изменяющемся климате: адаптация, устойчивость и продукционный процесс», Якутск, Россия, 2025. Международная научная конференция «Математика в созвездии наук» к юбилею академика В.А. Садовниченко, Москва, Россия, 2024. VI–VIII Национальная научная конференция с международным участием «Математическое моделирование в экологии» (ЭкоМатМод), Пушкино, Россия, 2019, 2021, 2023. II Международная научно-практическая конференция «Математическое моделирование систем и процессов», Псков, Россия, 2023. IV–VII Съезд биофизиков России, 2012, 2015, 2019 2023. XV–XIX Всероссийская молодежная научно-инновационная школа «Математика и математическое моделирование», Саров, Россия, 2021–2025. The 6<sup>th</sup> International Workshop on Deep Learning in Computational Physics, ОИЯИ, Дубна, Россия, 2022. XXII–XXIII Пушкинские чтения по фотосинтезу, Пушкино, Россия, 2022, 2025. Международная конференция «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем». XV съезд Белорусского объединения фотобиологов и биофизиков, Минск, Беларусь, 2022. Пятая Международная научная конференция Моделирование нелинейных процессов и систем, Москва, Россия, 2020. 10th International Meeting «Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability–2019», Санкт-Петербург, Россия, 2019. VII Международная конференция «Математическая биология и биоинформатика», г. Пушкино, Россия, 2018. XXVI Международная конференция «Математика. Экономика. Образование», Новороссийск, Россия, 2018. VIII–XX Съезд Российского фотобиологического общества. Всероссийская конференция «Современные проблемы фотобиологии», пос. Шепси, Краснодарский край, Россия, 2017, 2021, 2023. International Conference «Mathematical Modeling and Computational Physics, 2017», Дубна, ОИЯИ, Россия, 2017. 7<sup>th</sup> International Conference. Photosynthesis Research for Sustainability-2016, Пушкино, Московская область, Россия, 2016. VIII–XXXII Международных конференциях «Математика. Компьютер. Образование», Пушкино, Дубна, Россия, 2000-2025.

## **Благодарности**

Автор выражает искреннюю благодарность научному консультанту, профессору Андрею Борисовичу Рубину, за неоценимую помощь в подготовке данной работы.

Автор выражает глубокую признательность своему научному наставнику и научному консультанту, профессору Галине Юрьевне Ризниченко, чье мудрое руководство, неизменная поддержка и многолетняя совместная работа сформировали автора как ученого и определили его научный путь.

Автор искренне благодарит сотрудников кафедры биофизики биологического факультета МГУ за плодотворное сотрудничество.

## **Публикации**

Основные положения, результаты и выводы диссертации отражены в 28 научных трудах, 25 из которых опубликованы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.8. Математическая биология, биоинформатика (физико-математические науки).

## **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 226 страницах и содержит 57 рисунков и 20 таблиц. Диссертация включает 6 глав, в том числе обзор литературы, описание методов исследования и результаты работы, а также обсуждение результатов, заключение, выводы, список цитируемой литературы из 195 наименования.

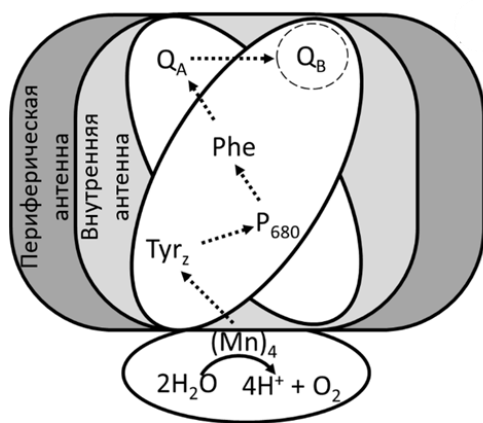
## **II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

В главе 1 диссертации дается обоснование теоретических основ исследования переходных процессов в фотосинтетических клетках. В ней рассматриваются ключевые концепции, лежащие в основе современного понимания динамики биологических систем: иерархическая организация, нелинейность, а также методы анализа. Переходный процесс определяется как кратковременная динамическая перестройка ключевых параметров клетки (состояний пигмент-белковых комплексов, активности ферментов, концентраций метаболитов). Фотосистема II (ФСII) представлена как идеальная модельная

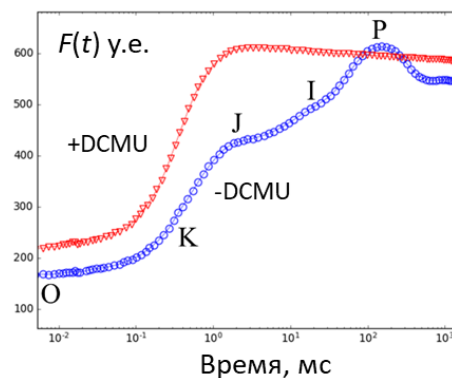
система для изучения переходных процессов благодаря своей чувствительности к внешним воздействиям и высокому временному разрешению экспериментальных методов.

Центральное место в главе занимает концепция иерархической организации биологических систем. Временная иерархия от пико- и наносекунд (фотохимические реакции) до часов и дней (рост клетки) определяет стратегию анализа: изменение динамики «быстрых» процессов может служить индикатором «медленных» перестроек. Глава также освещает фундаментальную роль нелинейной динамики в биологических системах. Нелинейность, обусловленная положительными и отрицательными обратными связями, приводит к появлению сложных режимов: бистабильности, гистерезиса, автоколебаний. Анализ переходных процессов позволяет не только описывать изменения, но и восстанавливать клеточные механизмы, лежащие в их основе, что является основой для создания прогностических моделей и инструментов управления устойчивостью фотосинтетических организмов.

В главе 2 представлены модели и методы, разработанные для анализа переходных процессов в электрон-транспортной цепи ФСII. Переходные процессы в фотосинтезирующих организмах, возникающие при изменении светового режима, действии стрессовых факторов или смене условий роста, отражают динамическую перестройку клеточных систем, в частности, фотосинтетического аппарата. Ключевым и наиболее хорошо изученным молекулярным комплексом фотосинтетического аппарата является ФСII (рис. 1а). Кривая индукции флуоресценции хлорофилла *a*, регистрируемая при освещении образцов после темновой адаптации, имеет характерные фазы (O, J, I, P) и является одним из наиболее информативных неинвазивных инструментов для изучения таких перестроек, поскольку отражает кинетику переходов между состояниями ФСII (рис. 1б).



а



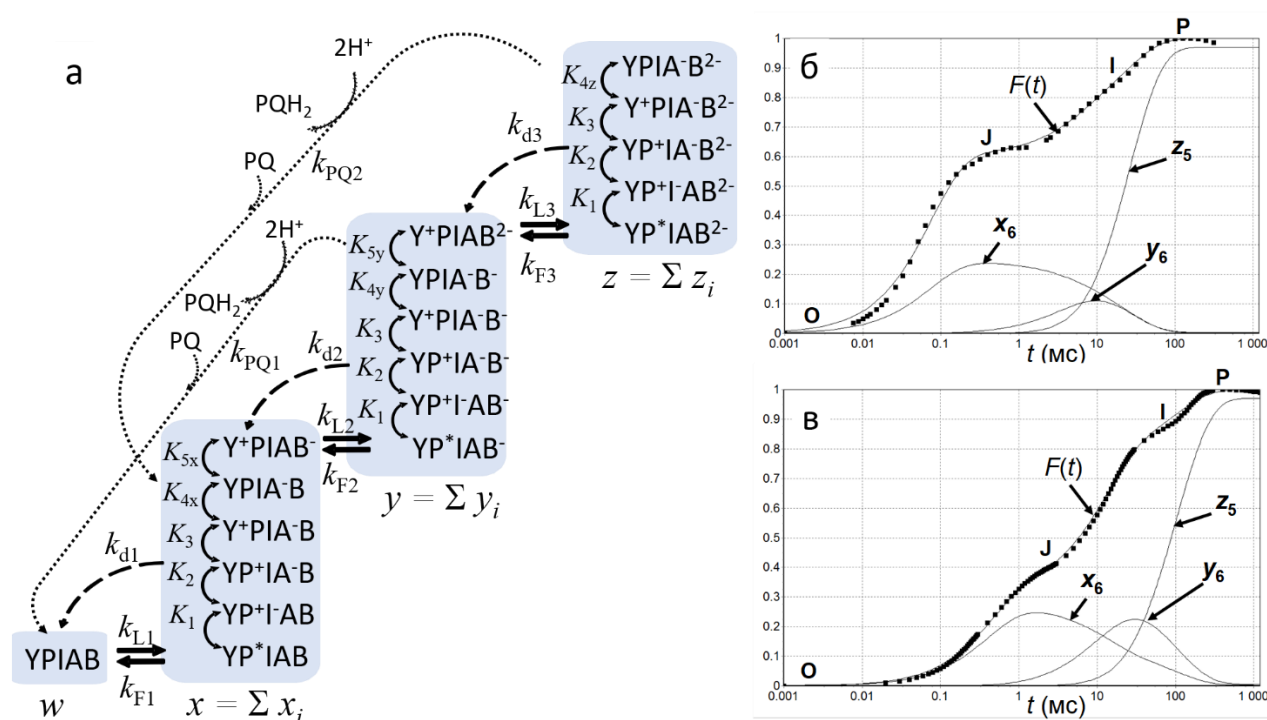
б

Рисунок 1 – Характеристики фотосистемы II:

- а – схематическое изображение комплекса фотосистемы II; элементы ФСII:  $(Mn)_4$  – кислород-выделяющий комплекс (марганцевый кластер); TyrZ – тирозин-Z;  $P_{680}$  – димер хлорофилла *a*; Phe – феофитин;  $Q_A$  – первичный хинон,  $Q_B$  – вторичный хинон; сплошной стрелкой показана реакция окисления воды, пунктирными стрелками – транспорт электрона;
- б – типичные кривые индукции флуоресценции хлорофилла, измеренные в присутствии DCMU и без DCMU.

Для интерпретации фаз индукционной кривой (ИК) необходимо их корректное сопоставление с элементарными процессами в ФСII. Существующие подходы анализа ИК имеют определенные ограничения: в ЛР-тесте параметры строго привязаны к точкам ИК по времени, многочисленные детальные модели могут давать неоднозначные результаты при решении обратной задачи из-за высокой размерности и жесткости системы. В данной главе развивается подход к построению редуцированных моделей ФСII, основанный на существующей иерархии времен переходов между ее состояниями (от пикосекунд до сотен миллисекунд). В главе также представлен метод мультиэкспоненциальной аппроксимации (СМЭА), позволяющий выделять фазы ИК, не выявляемые при визуальном анализе.

В разделе 2.1. представлена модель ФСII на основе предположения о квазиравновесии состояний. Для построения детальной модели были рассмотрены основные состояния ФСII и переходы между ними, возникающие в ответ на действие света (рис. 2а). Было сделано предположение, что процессы переноса электрона находятся в квази-равновесии по отношению к световым реакциям, поскольку скорость световых стадий, определяемая частотой поглощения квантов света, существенно меньше скорости переноса электронов.



Ввод новых переменных  $x = \sum_{i=1}^6 x_i$ ,  $y = \sum_{i=1}^6 y_i$ ,  $z = \sum_{i=1}^5 z_i$ , каждая из которых отражала сумму состояний в квази-равновесии, и соответствующие математические преобразования позволили получить редуцированную модель для этих переменных, которая с учетом закона сохранения ( $w + x + y + z = w_0$ ) имела следующий вид:

где  $q_{ij}$  – эффективные параметры, выраженные через исходные константы на рисунке 2а. Флуоресценция  $F(t)$  вычислялась как сумма всех флуоресцирующих состояний. Аналитическое решение модели представляет собой сумму 3-х экспоненциальных функций, что позволяет использовать его для описания трехфазных экспериментальных ИК. В результате численной оптимизации редуцированной модели по серии экспериментальных ИК были определены эффективные параметры модели и оценен вклад каждого типа состояния в общую кривую индукции флуоресценции (рис. 2б, в). Связь в явном виде эффективных параметров  $q_i$  и элементарных констант модели позволила при фиксировании отдельных констант детальной модели по литературным источникам определить другие константы: световые константы  $k_{Li}$ , константы безызлучательных переходов  $k_{di}$  и константы взаимодействия молекул пластохинона с  $Q_B$ -сайтом  $k_{PQi}$ . Сравнение световых констант  $k_{Li}$ , полученных для клеток водоросли и листьев фасоли, показало, что для клеток водоросли световая константа примерно в семь раз выше, чем для листьев фасоли, что может указывать на больший размер светособирающей антенны.

Таким образом, с помощью разработанной модели удалось выделить иерархические уровни состояний ФСII: состояния с одним, двумя или тремя электронами. Анализ кривых индукции флуоресценции с помощью полученной модели выявил существенные различия между высшими растениями и водорослями, что указывает на ограничение широко применяемого метода анализа – ЛР-теста для анализа ИК. Предложенная стратегия редукции позволила вместо неоднозначной оценки большого числа элементарных констант определить эффективные параметры, характеризующие основные этапы переходного процесса в ФСII при включении света. Такой подход существенно упрощает решение обратной задачи кинетического моделирования – оценки констант реакций по экспериментальным кривым.

В разделе 2.2. представлена иерархическая модель процессов в ФСII в условиях действия ингибитора DCMU. Индукционные кривые (ИК),

характерные для такой системы, визуально имеют однофазный характер (рис. 1б, красная кривая), однако выявление дополнительных фаз на такой кривой широко используется для оценки гетерогенности реакционных центров, различающихся по размеру светособирающего антенного комплекса, либо наличием и внутренней и внешней антенны ( $\alpha$ -центры), либо только внутренней антенны ( $\beta$ -центры).

Детальная схема ФСII при действии ингибитора DCMU, блокирующего перенос электрона на вторичный хинон, включает 24 состояния (рис. 3).

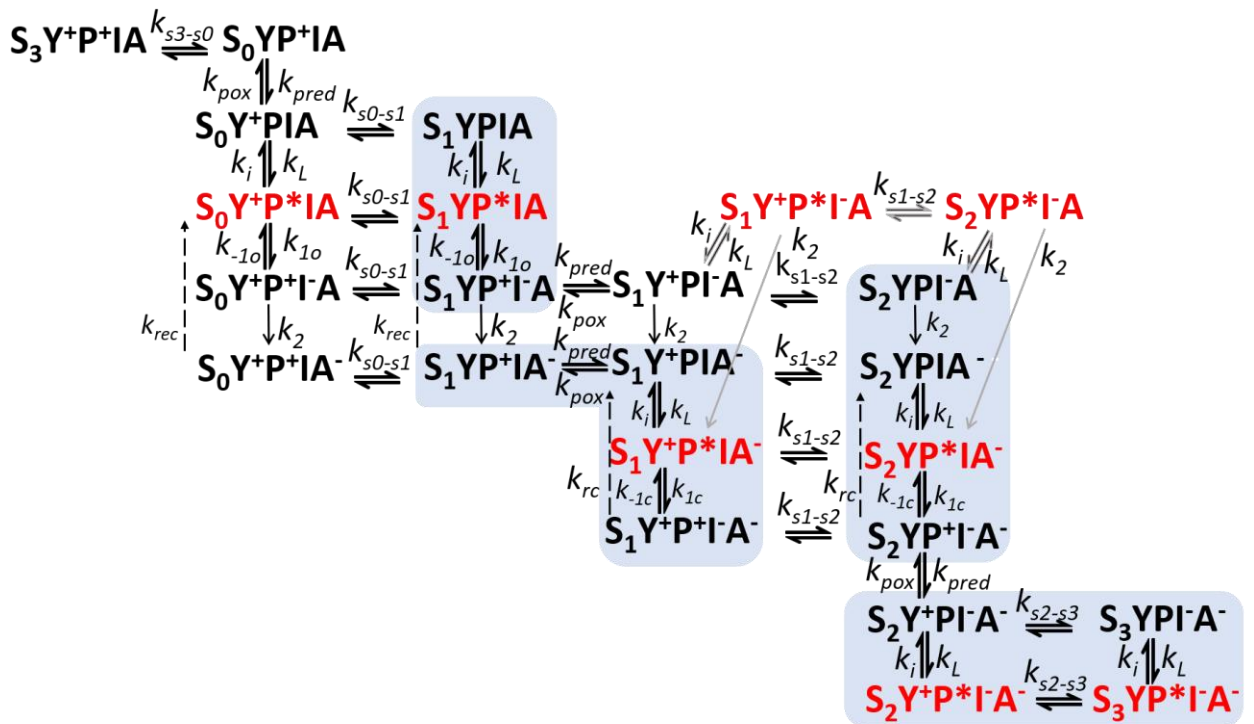


Рисунок 3 – Схема переходов между состояниями ФСII с учетом действия DCMU, блокирующего перенос с  $Q_A$  на  $Q_B$ ; красным цветом выделены возбужденные состояния;  $S_n$  ( $n = 0, 1, 2, 3$ ) – кислород-выделяющий комплекс (КВК); Y – тирозин; P – пигмент реакционного центра  $P_{680}$ ; I – феофитин; A – первичный хинон  $Q_A$ ;  $k_i$  – константы скоростей элементарных реакций.

Использование подхода, описанного в разделе 2.1., позволило провести редукцию модели, состоящей из 24 линейных обыкновенных дифференциальных линейных уравнений вида  $\frac{dx_i}{dt} = \sum_j k_{ij}x_j$ , до двух и найти аналитическое решение для описания ИК:

$F(t) = A_1 \cdot (1 - e^{-k_x \cdot t}) + A_2 \cdot (1 - e^{-k_y \cdot t})$ , где  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $k_x$  и  $k_y$  – параметры, состоящие из сочетаний констант элементарных стадий детальной модели.

Форма такой ИК будет определяться знаками амплитуд  $A_1$  и  $A_2$ , зависящими от конкретного сочетания входящих в них констант (рис. 4).

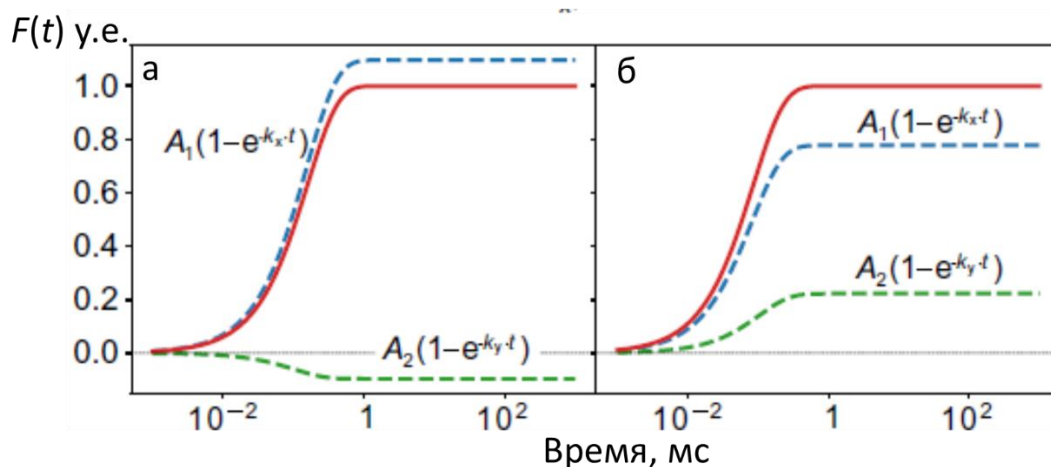


Рисунок 4 – Вклад экспоненциальных фаз (зеленая и синяя штриховые кривые) в общее решение модели (красная кривая): а – при  $k_L = 8 \text{ ms}^{-1}$ ; б – при  $k_L = 15 \text{ ms}^{-1}$ .

Первая экспоненциальная функция  $A_1 \cdot (1 - e^{-k_x t})$  (рис. 4, синие кривые) описывает процессы, связанные с антенной. Вторая экспоненциальная функция  $A_2 \cdot (1 - e^{-k_y t})$  (рис. 4, зеленые кривые) описывает процессы, связанные с КВК. При низких и средних интенсивностях света эта функция дает отрицательный вклад в общую кривую (рис. 4а, зеленая кривая), что обуславливает «сигмоидность» начального участка. Появление такой «сигмоидности» обычно объясняют существованием связности реакционных центров. Модель дает альтернативную интерпретацию, показывая, что начальный участок кривой отражает процессы в кислород-выделяющем комплексе (КВК). Необходимо подчеркнуть, что при высоких интенсивностях света вторая экспоненциальная функция дает положительный вклад (рис. 4б, зеленая кривая) в общую индукционную кривую, и при разложении ИК другими методами может ошибочно интерпретироваться как наличие реакционных центров с другим размером антенны ( $\beta$ -центры). Таким образом, модель позволяет избежать ошибочной интерпретации фаз ИК и провести их корректный анализ.

Простой вид полученной модели позволил составить комбинацию для моделирования суммарной флуоресценции реакционных центров ФСII с разным размером антенны ( $\alpha$ - и  $\beta$ -центры) и различной активностью КВК.

Флуоресценцию с учетом разных долей  $\alpha$ - и  $\beta$ -центров и различной активностью КВК можно записать как  $F = \alpha \cdot (s \cdot F_{\alpha}^{s+} + (1 - s) \cdot F_{\alpha}^{s-}) + \beta \cdot (s \cdot F_{\beta}^{s+} + (1 - s) \cdot F_{\beta}^{s-})$ , где  $F_{\alpha,\beta}^{s+}$  – флуоресценция  $\alpha,\beta$ -центров с активным КВК,  $s$  – доля активных КВК,  $F_{\alpha,\beta}^{s-}$  – флуоресценция  $\alpha,\beta$ -центров с неактивным КВК,  $\alpha$  и  $\beta$  – доли  $\alpha$ - и  $\beta$ -центров.

В разделе 2.3. представлен метод спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации (СМЭА) для анализа переходных процессов в ФСII по кривым индукции флуоресценции. Для проведения спектрального анализа кинетика ИК аппроксимировалась мультиэкспоненциальным рядом с фиксированными характерными временами  $\tau_n$ :  $F(t) = F_0 + \sum_{n=1}^N A_n (1 - e^{-t/\tau_n})$ , где  $F_0$  – минимальное значение на кривой индукции флуоресценции  $F(t)$ ,  $A_n$  отражает вклад  $n$ -й экспоненты с характерным временем  $\tau_n$  в общий сигнал,  $t$  – время. Для однозначного разложения  $A_n$  были ограничены строго положительными значениями. Характерные времена  $\tau_n$  выбирались на фиксированной логарифмической сетке с шагом  $k_{\text{step}}$ :  $\tau_{n+1} = k_{\text{step}} \tau_n$ . Результат аппроксимации входного сигнала  $F(t)$  (рис. 5а) мультиэкспоненциальным рядом представляет собой набор амплитуд  $A_n$ , соответствующих выбранным фиксированным временам  $\tau_n$ . Суммирование полученных амплитуд  $A_n$  на каждом шаге сетки дает ступенчатую функцию  $\sum_{i=1}^n A_i$  (рис. 5б). Число «ступенек» определяет число экспоненциальных функций, на которые раскладывается исходная кривая. Каждая «ступенька» характеризует вклад соответствующей экспоненты, ее амплитуду и характерное время. Для визуализации большого числа данных было разработано представление фаз кривой с помощью цвета. Спектр характерных времен от 1 мкс до 1 с соответствует цветовой шкале от синего к желтому. Ступенчатая функция на рисунке 5б, полученная в результате преобразования из кривой на рисунке 5а, преобразуется в полосу, отдельные части которой раскрашены в цвета, соответствующие характерным временам выделенных фаз ( $\tau_{OJ}$ ,  $\tau_L$ ,  $\tau_{IP}$ ), а высота соответствует амплитудам этих фаз (рис. 5в).

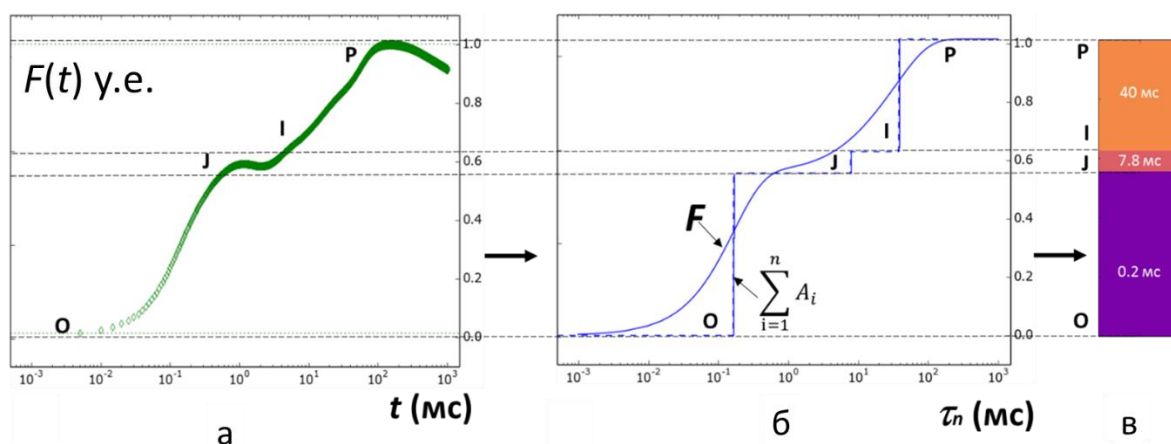


Рисунок 5 – Иллюстрация метода СМЭА; а – индукционная кривая  $F(t)$  для *C.reinhardtii*; б – кривые после преобразования; F– кривая получена аппроксимацией суммы экспонент;  $\sum_{i=1}^n A_i$  – ступенчатая функция получена вычислением на каждом шаге сетки частичных сумм амплитуд; в – визуализация фаз с помощью цвета; цвет полосы определяет характерное время  $\tau_{ij}$  соответствующей фазы, высота полосы – ее амплитуду.

Объединение таких полос, полученных при обработке большого количества данных, в тепловую карту дает визуальное представление о динамике фаз индукционной кривой в процессе роста культуры. Предложенный метод СМЭА был реализован в виде модуля для пакета ruPhotoSyn.

## Основные результаты главы 2

1. Разработан иерархический подход, позволяющий корректно редуцировать кинетические модели ФСП, количественно описывать кривые индукции флуоресценции и оценивать элементарные константы переноса электронов путем «разворачивания» эффективных параметров.
2. Предложена редуцированная модель ФСП для анализа гетерогенности реакционных центров кривых при действии DCMU. Полученное аналитическое решение позволило корректно объяснить фазы индукционной кривой, в том числе сигмоидность начального участка. Комбинация, составленная из нескольких таких моделей с разными параметрами, позволяет оценивать доли реакционных центров с разным размером светособирающей антенны, доли реакционных центров с активным и неактивным КВК и их перераспределение при изменении внешних условий.

3. Предложен и реализован метод спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации (СМЭА) для анализа динамических характеристик кривых индукции флуоресценции, позволяющий выявлять визуально неидентифицируемые фазы на таких кривых, оценивать их амплитуды и характерные времена. Визуализация с помощью теплокарт позволяет одновременно анализировать большой массив экспериментальных кривых.

В **3 главе** продемонстрировано применение редуцированных моделей и метода спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации (СМЭА) для анализа действия стрессовых факторов: минерального голодания, действия токсикантов и изменения светового режима. Данные воздействия вызывают перестройку фотосинтетического аппарата, которая проявляется в изменении формы индукционной кривой (ИК). Анализ переходных процессов в условиях стресса позволяет выявить ранние признаки таких перестроек, часто предшествующих видимым изменениям в росте или пигментации. Особое внимание уделено способности предложенных методов детектировать скрытые фазы ИК, которые могут служить индикаторами перестройки на других иерархических уровнях. В дополнение к разработанным в главе 2 методам были использованы также и традиционные методы анализа ИК, такие как JIP-тест, анализ разностных кривых и методы машинного обучения.

В **разделе 3.1.** на основе анализа массива ИК, полученных для клеток водоросли *Chlorella vulgaris*, культивируемых в фотобиореакторе, данных по изменению состава среды и оптических характеристик суспензии микроводорослей исследуются переходные процессы в фотосинтетическом аппарате клеток при естественном истощении (выедании) азота в среде. Азотное голодание приводит к постепенному истощению запасов азота в клетке, что сопровождается разборкой светособирающих комплексов, снижением содержания хлорофилла и изменением активности фотосинтетического аппарата. Однако видимые изменения проявляются с существенной задержкой. С помощью СМЭА были выявлены резкие уменьшения амплитуд фаз ОJ и JI на ИК на ~30 ч. роста культуры. (стадия линейного роста) (рис. 6), которые затем

вновь начали увеличиваться. Было обнаружено, что момент резких изменений на ИК совпадает с моментом истощения азота в среде (при этом в самой клетке находилось еще достаточное количество запасов соединений азота). На ~35 ч. роста культуры было выявлено появление новой фазы ОК с характерными временами, соответствующими процессам в кислород-выделяющем комплексе (КВК) (рис. 6), указывающей на торможение процессов в этом комплексе.

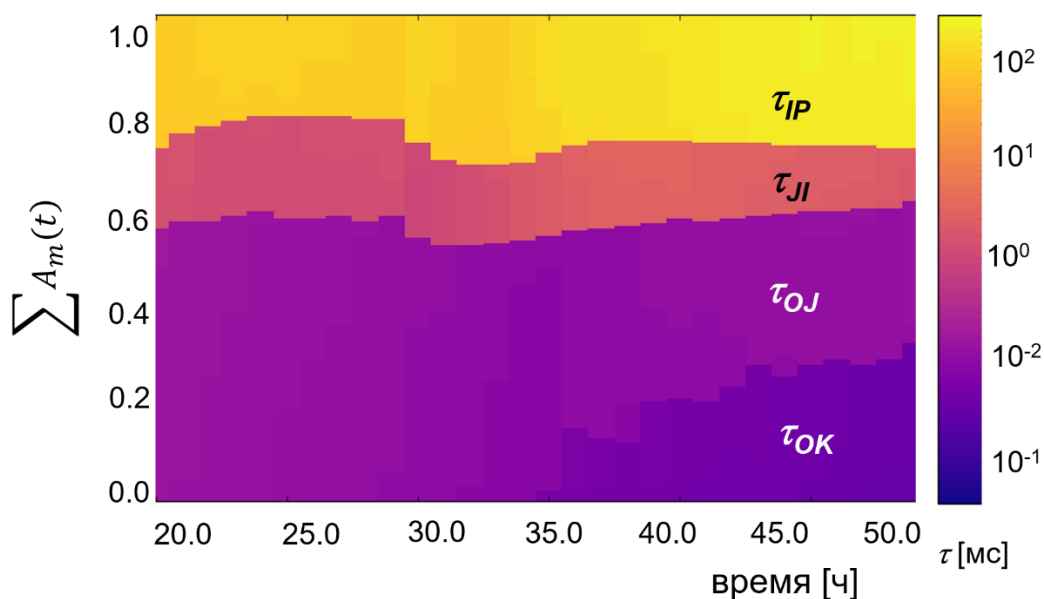


Рисунок 6 – Амплитуды фаз мультиэкспоненциальной аппроксимации ОЛР-кривых для каждого часа роста культуры в фотобиореакторе;  $\tau_{OK} \sim 0,15 - 0,25$  мс,  $\tau_{OJ} \sim 0,4 - 0,5$  мс,  $\tau_{JI} \sim 2,6 - 4,2$  мс,  $\tau_{IP} \sim 55 - 130$  мс.

С помощью редуцированной модели были проанализированы ИК, полученные для образцов, обработанных DCMU, на разных часах роста культуры. Для каждого выбранного часа было измерено несколько ИК при различных интенсивностях света. Это позволило существенно снизить неоднозначность при параметризации модели, поскольку оптимизация проводилась одновременно по всем кривым с единым набором параметров, за исключением световой константы, которая менялась пропорционально интенсивности света. Анализ с помощью редуцированной модели выявил снижение доли реакционных центров с активным КВК на 45% при истощении азота в среде, причем наиболее резкие изменения наблюдались в диапазоне 33-35 ч. роста, что согласуется с результатами СМЭА. Помимо снижения активности КВК было обнаружено, что на 15% уменьшается доля  $\alpha$ -центров. Таким образом,

в ответ на стресс, вызванный истощением азота в среде, в фотосинтетическом аппарате могут возникать кратковременные перестройки (переходные процессы), при которых скорость переноса электрона по цепи электронного транспорта внутри ФСII сначала резко возрастает, что, по-видимому, может рассматриваться как адаптивная перестройка, направленная на снижение фотоповреждения при ограниченном синтезе белков. Затем, поскольку стресс продолжает действовать, скорость переноса электрона вновь замедляется, а гетерогенность ФСII начинает возрастать за счет накопления реакционных центров с уменьшенной антенной и неактивным КВК. Таким образом, с помощью комплекса математических методов (стандартных и разработанных в данной работе) можно выделить временные интервалы, в которых система находится под действием стресса, но сохраняет функциональную активность. В этот период наблюдается наиболее активное накопление липидов, потенциального продукта для производства биотоплива.

В разделе 3.2. с помощью редуцированной модели проводится анализ перестройки фотосинтетического аппарата пяти различных видов водорослей при увеличении интенсивности света, на котором они росли, с  $8 \text{ Вт/м}^{-2}$  до  $16 \text{ Вт/м}^{-2}$ . Анализ изменения доли  $\alpha$ - и  $\beta$ -центров показал, что у *Chlorella* и *Stichococcus* доля  $\alpha$ -центров падала на 8-10% при росте на более высоком свете, тогда как у *Pleurochloris*, наоборот, возрастала, а у *Ankistrodesmus* и *Scenedesmus* практически не менялась. Доля активных КВК при росте на более высоком свете значительно менялась у *Chlorella* (уменьшалась на ~60%) и у *Ankistrodesmus* (увеличивалась на ~ 65%), умеренно – у *Scenedesmus* и *Stichococcus*, и практически не менялась у *Pleurochloris*. Наблюдаемая межвидовая вариабельность количества  $\alpha$ - и  $\beta$ -центров и активности КВК при изменении интенсивности света указывает на отсутствие универсального механизма адаптации даже у близкородственных водорослей. Это подчеркивает необходимость осторожной экстраполяции выводов, полученных для одного модельного организма на другой при интерпретации данных фотосинтетической динамики.

В разделе 3.3. демонстрируется применение комплекса математических методов, включающего анализ главных компонент (РСА), математическое моделирование, ЛР-тест и анализ разностных кривых, для изучения динамического ответа фотосистемы II (ФСII) в клетках *Chlorella vulgaris* при воздействии токсикантов, солей кадмия и хрома ( $\text{CdSO}_4$  и  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) в концентрациях 20 и 50 мкМ, на растущую в биореакторе культуру. Использование РСА позволило сгруппировать ИК, близкие по форме, и выявить различия в действии разных токсикантов в разных концентрациях. ЛР-тест выявил изменения в функциональности ФСII (переходный процесс) в течение 5 часов после начала воздействия. Использование редуцированной модели позволило получить представление об изменении гетерогенности реакционных центров в процессе роста в условиях стресса. Комплексное использование этих методов показало, что снижение эффективности ФСII происходило в основном за счет снижения активности КВК (на ~60% для  $\text{CdSO}_4$  и ~20% для  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), при этом не наблюдалось существенных изменений в антенном комплексе.

### *Основные результаты главы 3*

1. Применение комплекса математических методов, как традиционных (ЛР-тест, метод разностных кривых, РСА), так и разработанных в данной работе (редуцированная модель ФСII, СМЭА) к массиву ИК, полученных для культуры *Chlorella vulgaris*, культивируемой в фотобиореакторе и подвергающейся действию различных факторов стресса: азотное голодание, действие токсикантов, рост при разной освещенности, позволило выявить перестройку фотосинтетического аппарата до появления макроскопических признаков повреждения, что подтверждает высокую чувствительность этих методов для раннего детектирования стресса.

2. Изменение интенсивности света вызывает видоспецифичные адаптации: различия в динамике количества  $\alpha$ - и  $\beta$ -центров, размера светособирающей антенны и активности КВК у пяти видов водорослей, что свидетельствуют о существовании разных стратегий адаптации даже у таксономически близких видов.

В главе 4 с помощью интеграции кинетической и потоковой моделей процессов в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* анализируются переходные процессы при серном голодании. В условиях дефицита серы в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* происходит перестройка метаболизма, ведущая к активации выделения водорода – процесса, представляющего большой интерес для биотехнологии. Однако сам переход в новое состояние, имеющий пороговый характер, остается малоизученным; неизвестно, какие механизмы управляют этим переходом, изменение каких параметров является критическим. Предложенный комплексный подход позволяет количественно охарактеризовать динамику этого перехода и выявить ключевые параметры, при которых инициируется триггерное переключение.

В разделе 4.1. представлена кинетическая модель, включающая несколько иерархических уровней: электрон-транспортные пути через ФСII и цепь хлородыхания и динамику протонов вблизи стромальной стороны тилакоидной мембраны. Анализ экспериментальных индукционных кривых (ИК) показал, что уже через 24 часа после начала действия факторов стресса происходит изменение формы ИК, увеличивается  $F_0$ , резко снижается  $F_v/F_m$ , появляются новые фазы, связанные с накоплением восстановленного пластохинона. Эти изменения сопровождаются падением фотосинтетического выделения  $O_2$  почти до нуля, что указывает на подавление линейного электронного транспорта.

Разработанный во 2 главе иерархический подход был использован для моделирования наблюдаемой в экспериментах скачкообразной динамики процессов в фотосинтетическом аппарате *Chlamydomonas* при серном голодании. Одной из целей этого раздела было продемонстрировать, что наблюдаемая нелинейная динамика (резкое переключение в другой режим функционирования) может возникать как естественное следствие взаимодействия элементарных линейных процессов, без введения нелинейных феноменологических выражений в уравнения. Схема процессов представлена на рисунке 7. Схема переходов между состояниями ФСII (рис. 7а) составлена с учетом группировки состояний по числу электронов на переносчиках, полученной в разделе 2.1 главы 2.

Дополнительно включено состояние с дважды протонированным первичным хиноном,  $Q_AH_2$ . Такое состояние является нетипичным для нормальных условий, однако может возникнуть в стрессовых условиях.

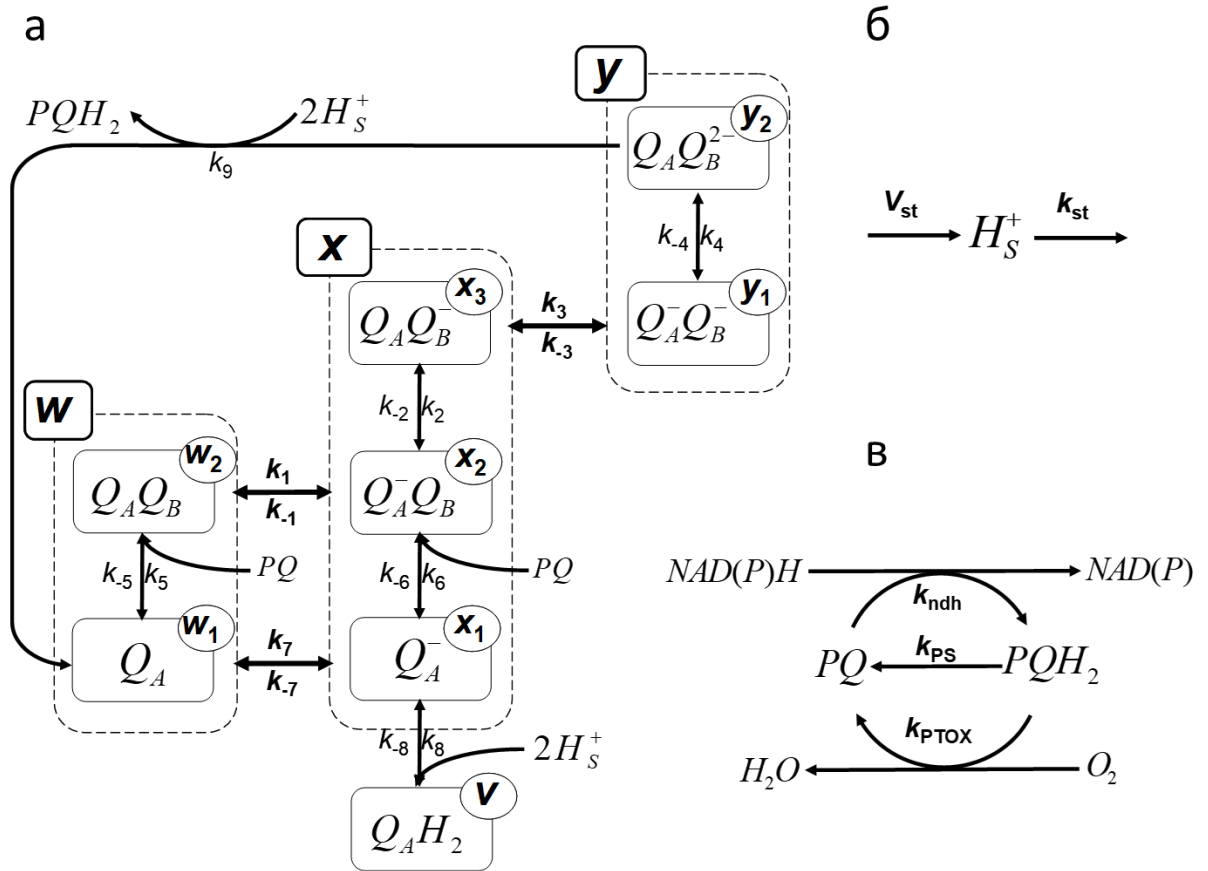


Рисунок 7 – Схема процессов модели. а – перенос электронов между состояниями фотосистемы II; состояния комплекса определяются степенью восстановления хинонных акцепторов; в пунктирные прямоугольники объединены состояния с одинаковым количеством электронов; б – реакции переноса протонов в строме вблизи тилакоидной мембраны;  $V_{st}$  – приток протонов из стромы к мембране тилакоида;  $k_{st}$  – отток протонов в строму; в – окислительно-восстановительные реакции пластохинона в цепи хлородыхания и фотосинтеза; NADH-дегидрогеназа в реакции  $k_{ndh}$  катализирует перенос электронов с  $NADH$  на  $PQ$ ; пластидная терминальная оксидаза, РТОХ, в реакции  $k_{PtoX}$  катализирует перенос электронов с  $PQH_2$  на кислород на стромальной стороне мембраны тилакоида;  $k_{PS}$  – реакция окисления пластохинона в цепи фотосинтеза.

В рассматриваемой системе все процессы распределяются по трем явно выраженным временным масштабам: быстрые (0,1–200 мс) – фотохимические реакции в ФСII; средние (30–50 с) – установление протонного градиента в строме и люмене; медленные (~30 ч) – изменение концентрации пластохинона  $PQH_2$  в реакции с NADH-дегидрогеназой за счет метаболической перестройки процессов в условиях стресса. Такая временная иерархия позволяет применить

теорему Тихонова и получить редуцированную систему для описания динамики протонов. Быстрые процессы (фотохимические стадии) считаются квазистационарными относительно изменения концентрации протонов в строме. При этом  $PQH_2$  может рассматриваться как параметр, поскольку изменения его концентрации происходят гораздо медленнее, чем изменения концентрации протонов. В результате такой редукции было получено эффективное нелинейное уравнение для динамики протонов  $H_s^+$  в строме вблизи тилакоидной мембраны:

$$\dot{H}_s^+ = g(H_s^+) - f(H_s^+), \text{ где}$$

$g(H_s^+) = V_{st} - k_{st} \cdot H_s^+$  отражает изменения концентрации протонов за счет пассивного обмена протонами между примембраным пространством вблизи тилакоида и объемом хлоропласта,

$$f(H_s^+) = \frac{q_1 q_3 q_9 [H_s^+]^2}{q_1 q_9 K_8 [H_s^+]^4 + (q_1 q_{-3} K_8 + q_9 q_3 + q_9 q_{-1} + q_9 q_1) [H_s^+]^2 + (q_3 q_1 + q_{-3} q_{-1} + q_{-3} q_1)} \quad \text{отражает}$$

скорость перекачивания протонов фотосистемой II из стромы в люмен,  $H_s^+$  – безразмерная концентрация протонов в строме вблизи мембраны,  $q_i$  – эффективные кинетические константы. Полученный нелинейный вид уравнения обусловлен присоединением двух протонов к каждому из хинонов. Уравнение имеет три стационарных состояния в положительной области значений  $H_s^+$ , что и обеспечивает триггерные (скачкообразные) переключения.

Совместное рассмотрение подсистем на разных иерархических уровнях позволило получить общую картину изменений процессов при серном голодании (рис. 8). Концентрация восстановленного пластохинона  $PQH_2$  является медленно меняющейся переменной, «включающей» быстрые триггерные изменения в концентрации протонов. Можно выделить три фазы развития процессов. I – постепенное накопление  $PQH_2$  за счет хлородыхания до критического уровня, в этих условиях система остаётся в стационарном состоянии активного фотосинтеза; II – достижение порога вызывает бифуркационное переключение, за 10–20 мин концентрация протонов в строме  $H_s^+$  резко возрастает, а скорость электронного транспорта падает, система переходит в новое устойчивое

состояние; III – длительное (десятки часов) пребывание в режиме с неактивной ФСII.

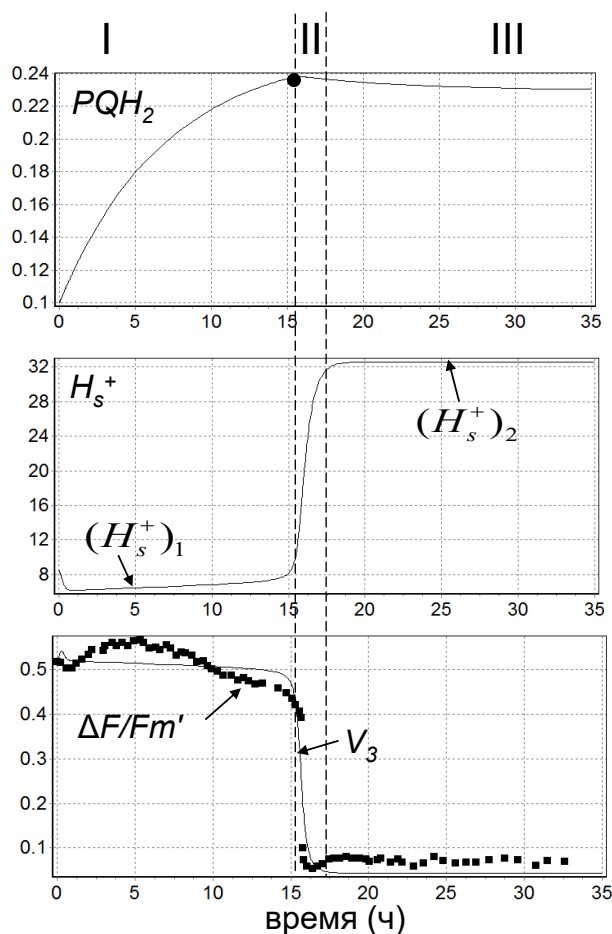


Рисунок 8 – Кинетика переключения системы между стационарными состояниями в процессе серного голодания; верхняя кривая – изменение концентрации восстановленного пластохинона; средняя кривая – изменение квазистационарной концентрации протонов в строме; нижняя кривая – изменение квазистационарной скорости переноса электронов с  $Q_A$  на  $Q_B$ ; точки – экспериментальные данные изменения активности фотосистемы II, полученные для *C. reinhardtii* в условиях серного голодания; линии – решения модели.

Результаты анализа модели позволили предложить следующий механизм кинетической регуляции процессов при наступлении стрессовых условий. В условиях серного голодания активация гликолиза приводит к накоплению NAD(P)H, активации хлородыхания и, как следствие, накоплению восстановленных форм пластохинона  $PQH_2$ . В результате начинает подавляться активность ФСII, что в свою очередь приводит к снижению скорости перекачки протонов в люмен, закислению стромы и накоплению дважды протонированной формы первичного хинона  $QAH_2$ , которая, будучи неспособной к переносу

электронов, дополнительно ингибирует ФСII. Возникающая петля положительной обратной связи приводит к триггерному переключению системы в новое устойчивое состояние со сниженной фотосинтетической активностью.

Таким образом, изменение соотношения окисленных и восстановленных форм пластохинона, обусловленное перенаправлением потока электронов в реакциях центрального метаболизма, выступает управляющим параметром для перераспределения потоков между фотосинтетической цепью и хлордыханием. Нелинейная организация электрон-транспортных потоков обеспечивает быстрое, скачкообразное переключение режимов функционирования ФСII, защищая фотосинтетический аппарат от повреждений при стрессе.

В разделе 4.2. представлена потоковая модель центрального метаболизма в клетках *Chlamydomonas*, разработанная для сопряжения метаболических реакций с переходными процессами на тилакоидной мембране, рассмотренными в предыдущем разделе. Модель построена как система балансовых уравнений для метаболитов (рис. 9), при условии их квазистационарности относительно фотохимических процессов. Переменными служат нормированные стационарные скорости (метаболические потоки). С помощью стандартной техники FBA (flux balance analysis) была получена система из 35 линейных алгебраических уравнений. Хотя система изначально недоопределена, наличие экспериментальных данных по отдельным потокам (рис. 9, серые столбики) позволило доопределить ее и рассчитать распределения метаболических потоков для четырех последовательных дней голодания (рис. 9, белые столбики).

Анализ распределений метаболических потоков выявил последовательность переключений направлений этих потоков при серном голодании. В первые сутки доминируют анаболические реакции (направленные на синтез и запасание питательных веществ) цикл Кальвина ( $V_1 = 3$ ), синтез крахмала ( $V = 1$ ), активная работа ФСII ( $V_2 = 6$ ). На вторые сутки происходит ключевое переключение, активность Рубиско падает на 75% ( $V_1 = 0,7$ ), а поток электронов от  $\text{PQH}_2$  на  $\text{NAD(P)H}$  становится отрицательным ( $V_{19} = -1.4$ ), что

указывает на изменение его направления. Одновременно запускается хлородыхание ( $V_{31} = 4,6$ ) и выделение водорода ( $V_{18} = 0,3$ ).

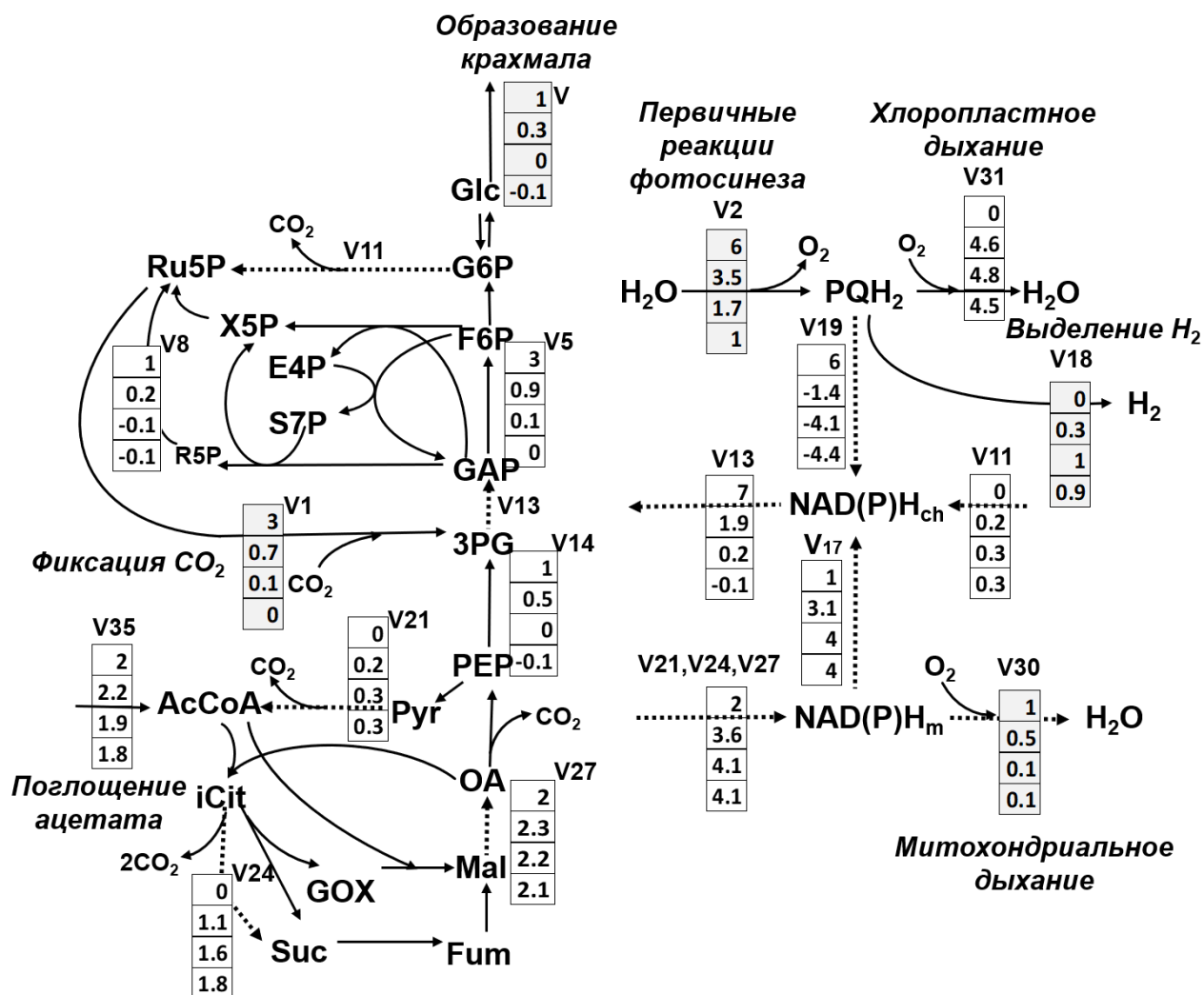


Рисунок 9 – Распределение метаболических потоков в центральных метаболических путях, а также пути фотосинтеза, дыхания и образования водорода в культуре *Chlamydomonas* за 4 суток серного голодания. В каждом столбце: верхняя цифра — начальное значение (0 ч), последующие — через 24, 48, 72 и 96 ч. Серые столбики – нормированные экспериментальные данные, белые – результаты модельного расчета.

G6P – Глюкозо-6-фосфат, F6P – фруктозо-6-фосфат, GAP – глицеральдегид-3-фосфат, 3PG – 3-фосфоглицерат, Ru5P – рибулозо-5-фосфат, X5P – ксилулозо-5-фосфат, R5P – рибозо-5-фосфат, E4P – эритрозо-4-фосфат, S7P – седугептулозо-7-фосфат, PEP – фосфоенол пируват, Pyr – пируват, AcCoA – ацетил коэнзим А, Cit – цитрат, GOX – глиоксилат, OA – оксалоацетат, Mal – малат, Fum – фумарат, Suc – сукцинат,  $\alpha$ KG –  $\alpha$ -кетоглутарат, NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат, восстановленный, PSII – фотосистема II, PQH<sub>2</sub> – пластохинон восстановленный, QH<sub>2</sub> – убихинон восстановленный, PSI – фотосистема I, Fd – ферредоксин, ndh – NADH-дегидрогеназа, PTOX – пластидная терминальная оксидаза, Fe-hyd – Fe-гидрогеназа.

На третьи-четвертые сутки Рубиско практически инактивирован ( $V_1 \approx 0$ ), активируется гликолиз, а поток  $V_{19}$ , направленный на восстановление PQH<sub>2</sub>, увеличивается. Максимум выделения водорода  $H_2$  ( $V_{18} = 1$ ) достигается на третьи

сутки, также как и максимум скорости хлородыхания ( $V_{31} = 4,8$ ), что указывает на переход в устойчивый катаболический режим (режим распада запасенных веществ).

Сопряжение кинетической и потоковой моделей позволяет получить целостную динамическую картину адаптации клеток *Chlamydomonas reinhardtii* к серному голоданию, в которой изменения быстрых фотохимических процессов обусловлены медленными метаболическими перестройками посредством общих управляющих параметров: редокс-состояния пластохинонового пула и концентрации NAD(P)H.

*Основные результаты главы:*

1. С помощью разработанной кинетической модели выявлен механизм триггерного переключения между состояниями активного фотосинтеза и режима выделения водорода. Показано, что нелинейная динамика процессов обусловлена учетом реакций двойного протонирования первичного хинона (без искусственного введения нелинейных членов). При этом вторичный хинон является управляющим параметром, запускающим переключение.
2. Построена потоковая модель центрального метаболизма, демонстрирующая поэтапное перераспределение потоков с анаболических (синтез метаболитов) путей на катаболические (распад метаболитов).
3. Показана взаимосвязь между кинетической и потоковой моделями через общие параметры ( $PQH_2$ , NAD(P)H), что позволяет описывать наблюдаемые в экспериментах переключения как иерархически организованные переходные процессы.

В главе 5 представлена модель для анализа переходных процессов в клетках *Chara corallina* при изменении световых режимов. Переходные процессы в клетках водоросли *Chara corallina*, обладающих гигантскими размерами до 10 см, при изменении светового режима сопровождаются сложной пространственно-временной перестройкой на поверхности клетки: длительными

колебаниями трансмембранного электрического потенциала, формированием чередующихся кислых и щелочных зон, и гистерезисом в возникновении таких зон. Эти процессы являются результатом взаимодействия фотосинтетических процессов и транспортных мембранных систем, включающих протонные АТФазы и ионные каналы. При включении света ответ клетки не является мгновенным, он развивается в течение минут и часов, и может включать несколько переходных фаз, каждая из которых отражает перестройку процессов.

На основе экспериментальных данных по динамике рН и потенциала была построена математическая модель типа «реакция-диффузия», описывающая формирование пространственных паттернов. Разработанная модель включает связь процессов трансмембранного и латерального (вдоль мембраны) переноса протонов и распределения потенциала вдоль мембраны. Для описания трансмембранного переноса протонов использовались данные о каталитическом цикле работы АТФазы и ион-проводящих каналов. Распределение потенциала вдоль мембраны описывалось исходя из кабельных свойств клеточной мембраны. При построении модели предполагалось, что основным процессом, определяющим нелинейный характер изменений мембранного потенциала, является перенос протонов через мембрану. Благодаря иерархии во временных масштабах динамика быстрых изменений состояний АТФазы описывалась в квазистационарном приближении, что позволило свести уравнение для внеклеточной концентрации протонов к одномерному диффузионно-реакционному уравнению. Окончательная система уравнений изменения трансмембранного потенциала и концентрации протонов состоит из двух уравнений:

$$\frac{\partial h_0}{\partial \tau} = \frac{h_0 e^{\psi} (1 - n)}{2q \cdot h_0 + e^{2\psi} (1 + h_0)^2 (n + 1)} - \gamma \cdot h_0 + D_1 \frac{\partial^2 h_0}{\partial r^2}$$

$$\frac{\partial \psi}{\partial \tau} = \frac{-h_0 e^{\psi(1-n)}}{2q \cdot h_0 + e^{2\psi} (1 + h_0)^2 (n + 1)} z - g(\psi - \psi_0) + D_2 \frac{\partial^2 \psi}{\partial r^2}.$$

Выражение  $\frac{h_0 e^{\psi(1-n)}}{2q \cdot h_0 + e^{2\psi} (1 + h_0)^2 (n + 1)}$  описывает поток протонов через АТФазу;

$\gamma h_0$  – обмен протонов между средой и клеткой за счет убыли протонов от поверхности клетки во внешнюю среду и пассивного потока через протонные каналы, не связанные с АТФазой, внутрь клетки;  $g(\psi - \psi_0)$  – ток утечки;  $n, \gamma, q, g, D_{1,2}$  – безразмерные параметры модели, сочетаний исходных элементарных констант. В качестве граничных условий принималось отсутствие потока  $H^+$  и градиента потенциала на торцах клетки. Идентификация модели по экспериментальным данным позволила сопоставить модельные режимы с нелинейными явлениями, наблюдаемыми в эксперименте.

Исследование точечной модели показало, что в системе может реализоваться субкритическая бифуркация Андронова-Хопфа, приводящая к жесткому возбуждению автоколебаний. При разных начальных условиях могут реализоваться два устойчивых режима – устойчивый фокус и устойчивый предельный цикл, бассейны притяжения которых разделены неустойчивым предельным циклом (рис.10 а)

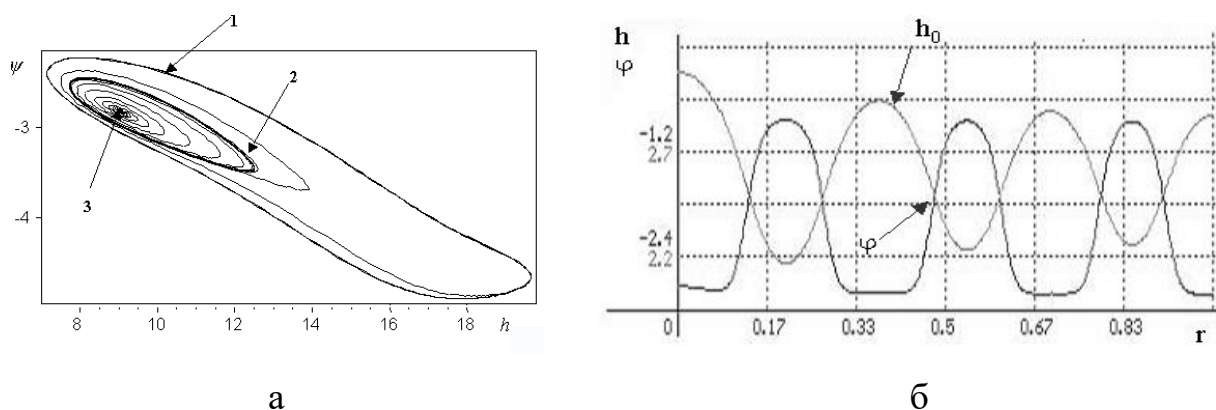


Рисунок 10 – Динамические режимы мембранного потенциала и концентрации протонов, полученные в численном счете. а – фазовый портрет системы, демонстрирующий существование нескольких устойчивых стационарных режимов: 1 - устойчивый предельный цикл (незатухающие колебания), 2 - неустойчивый предельный цикл, 3 - устойчивый фокус (затухающие колебания); б - профиль рН и потенциала вдоль клетки водоросли *Chara corallina*.

Анализ распределенной системы реакция-диффузия позволил найти условия возникновения диффузионной неустойчивости (бифуркации Тьюринга). В численных экспериментах при критическом значении параметра  $q$ , зависящем от интенсивности света, в системе возникали диссипативные структуры, соответствующие зонам с различным значением рН в реальной системе (рис. 11).

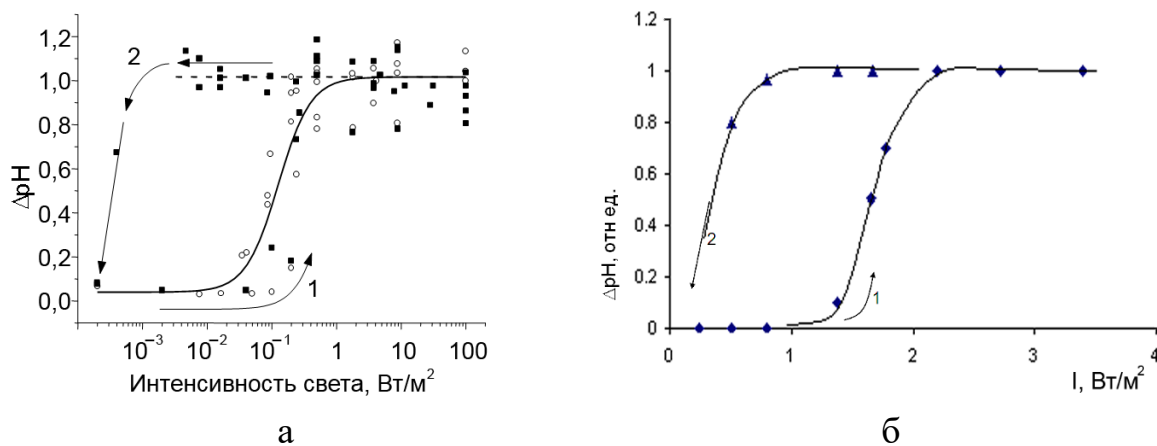


Рисунок 11 – Гистерезис в распределении рН вблизи клеточной мембраны *Chara carollina*. а – экспериментальные данные; значения  $\Delta pH$  на цитоплазматической мембране, полученные при освещении светом, интенсивность которого повышалась для каждого последующего эксперимента (светлые кружки) и понижалась (черные квадраты). б – результат моделирования; изменение максимального перепада рН между кислотными и щелочными зонами при увеличении (стрелка 1) и уменьшении (стрелка 2) интенсивности света.

Экспериментальные результаты, показанные на рисунке 11а, демонстрируют существование двух типов распределения рН при одной и той же величине интенсивности света. Переход от гомогенного стационарного состояния (структуры отсутствуют) к состоянию с высокой амплитудой пиков рН происходит при увеличении интенсивности света для каждого последующего эксперимента. В интервале от  $10^{-2}$  до  $1 \text{ Вт/м}^2$  амплитуда структур рН постепенно возрастает. Дальнейшее увеличение интенсивности не приводит к возрастанию  $\Delta pH$ . Когда измерения начинаются с больших интенсивностей света, обеспечивающих возникновение структур, и интенсивность света для каждого последующего измерения постепенно уменьшается, амплитуда  $\Delta pH$  практически не меняется вплоть до величины  $5 \cdot 10^{-3} \text{ Вт/м}^2$ . Таким образом, переход к гомогенному стационарному состоянию (отсутствие структур) в этом случае происходит при более низких интенсивностях, наблюдается явление гистерезиса. Результаты эксперимента были воспроизведены численно на модели (рис. 11 б).

Модель позволила предложить механизм, объясняющий наблюдаемые нелинейные пространственно-временные режимы. Согласно литературным данным в первичных реакциях фотосинтеза протоны накапливаются внутри

хлоропластов, что приводит к защелачиванию цитоплазмы. Это, в свою очередь, активирует протонные каналы, увеличивая пассивный вход протонов в клетку. Следствием является деполяризация плазматической мембраны и рост внутриклеточной концентрации  $H^+$ , что стимулирует работу  $H^+$ -АТФазы, которая переносит протоны наружу, вызывая гиперполяризацию мембраны и рост внеклеточной концентрации  $H^+$ . Последнее ингибирует АТФазу и одновременно активирует протонные каналы, замыкая положительную обратную связь, что и обеспечивает колебания потенциала и протонов. За счет разнонаправленных протонных потоков через каналы и АТФазу могут возникать локальные участки закисления и защелачивания, которые различаются по величине трансмембранного потенциала в примембранной области снаружи клетки. Устойчивые рН зоны (диссипативные структуры) образуются в результате диффузионной неустойчивости, возникающей за счет различия в коэффициентах диффузии протонов и потенциала.

Таким образом, переходный процесс в клетках *Chara* представляет собой интегрированный ответ, обусловленный взаимодействием фотосинтетических реакций (в хлоропластах), трансмембранного протонного переноса (через АТФазу и каналы) и латеральной диффузии протонов вдоль мембраны. Наблюдаемые пространственные паттерны рН и потенциала возникают в результате взаимодействия между этими уровнями, включающего положительную обратную связь.

#### *Основные результаты главы:*

1. Построена модель типа «реакция-диффузия» для описания потенциал зависимой активности протонной АТФазы в клетках *Chara corallina*, воспроизводящая экспериментальные данные и демонстрирующая колебательные режимы протонов и мембранного потенциала.
2. Установлено, что при смене светового режима у *Chara corallina* формируются пространственно-временные паттерны на поверхности клетки – чередующиеся кислые и щелочные зоны.

3. Обнаружен гистерезис в распределении рН и потенциала, свидетельствующий о наличии функциональной памяти в системе.

В главе 6 представлена модель популяционной динамики *Chlorella vulgaris* при фосфорном голодании, примененная к анализу переходных процессов на уровне клеточной культуры. Поскольку адаптация фотосинтезирующих организмов проявляется не только в индивидуальных клеточных ответах, но и в коллективной динамике популяции, модель интегрирует данные по росту культуры, изменениям пулов органического и неорганического фосфата, а также накоплению полифосфатов – запасных форм фосфора, представляющих биотехнологический интерес как сырье для удобрений. Целью главы 6 было выявить количественную связь между внутриклеточным перераспределением фосфатных пулов (в частности, синтезом и распадом полифосфатов) в отдельной клетке и макроскопическими показателями популяции клеток (выход биомассы).

Схема, описывающая взаимодействие реакций поглощения фосфатов и фосфорного метаболизма в клетках *Chlorella* представлена на (рис. 12).

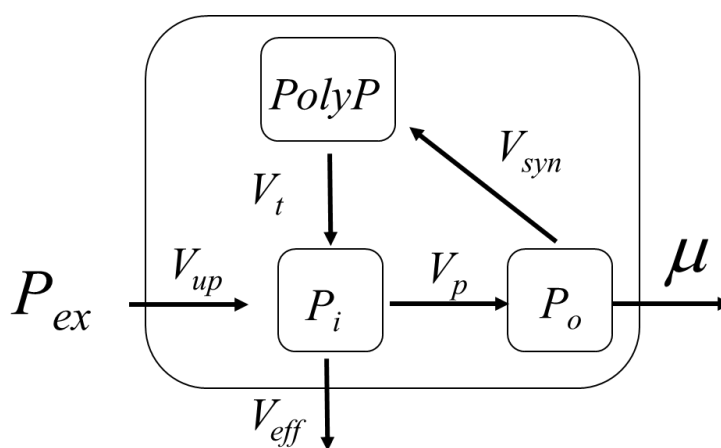


Рисунок 12 – Пути превращения фосфора в клетке водоросли.  $P_{ex}$  – неорганический фосфат в среде,  $P_o$  – органические соединения, содержащие Р),  $P_i$  – неорганический фосфат,  $PolyP$  – полифосфат.  $V_{up}$  – скорость поглощения фосфата клеткой,  $\mu$  – удельная скорость роста культуры,  $V_p$  – скорость образования органических соединений из  $P_i$ ,  $V_{syn}$  – скорость синтеза  $PolyP$ ,  $V_t$  – скорость гидролиза  $PolyP$ ,  $V_{eff}$  – скорость оттока  $P_i$  из клетки

Было предположено, что скорость реакции гидролиза полифосфатов  $V_t$  регулируется фактором R (инозитол пиродифосфат), активность которого зависит

от уровня неорганического фосфата клетки  $P_i$ . Уравнения модели с учетом размеров пулов фосфатов (клеточных квот) представлены в таблицах 1 и 2.

**Таблица 1.** Уравнения, описывающие процессы на рисунке 12.

| Процесс                                   | Уравнение                                                                                                                               | Размерность                                           |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Скорость деления клеток                   | $\frac{dC}{dt} = \mu' \cdot (1 - \frac{C}{K_f}) \cdot C = \mu \cdot C$                                                                  | $\frac{\text{кЛ}}{\text{мл} \cdot \text{ч}}$          |
| Захват внешнего фосфата $P_{ex}$ клетками | $\frac{dP_{ex}}{dt} = -V_{up} \cdot C \cdot c + V_{eff} \cdot C \cdot 10^{-10}$                                                         | $\frac{\text{мкМ}}{\text{мл} \cdot \text{ч}}$         |
| Изменение внутриклеточного пула $P_i$     | $\frac{dP_i}{dt} = V_{up} - V_p + V_t - V_{eff} - \mu \cdot P_i$                                                                        | $\frac{\text{мкМ}}{10^{10} \text{кЛ} \cdot \text{ч}}$ |
| Изменение внутриклеточного пула $P_o$     | $\frac{dP_o}{dt} = V_p - V_{syn} - \mu \cdot P_o$                                                                                       | $\frac{\text{мкМ}}{10^{10} \text{кЛ} \cdot \text{ч}}$ |
| Изменение внутриклеточного пула $PolyP$   | $\frac{dPolyP}{dt} = V_{syn} - V_t - \mu \cdot PolyP$                                                                                   | $\frac{\text{мкМ}}{10^{10} \text{кЛ} \cdot \text{ч}}$ |
| Динамика регулятора $R$                   | $\frac{dR}{dt} = \frac{V_R \cdot (P_i - Q_{P_i \min})^n}{(P_i - Q_{P_i \min})^n + K_R^n} \frac{Q_{R \max} - R}{Q_{R \max}} - k \cdot R$ | $\frac{\text{мкМ}}{10^{10} \text{кЛ} \cdot \text{ч}}$ |

**Таблица 2.** Выражения скоростей.  $V_{1,2,...,7}$  — максимальные скорости;  $K_{1,2,...,7}$  — константы полунасыщения (константы Михаэлиса);  $Q_{P_o \max}$ ,  $Q_{P_i \max}$  и  $Q_{PolyP \max}$  — максимальные квоты для органических фосфорсодержащих соединений, внутриклеточного неорганического фосфата и пулов полифосфата;  $Q_{P_o \min}$ ,  $Q_{P_i \min}$  и  $Q_{PolyP \min}$  — соответствующие минимальные квоты.

| Процесс                                                                    | Уравнение                                                                                                                                                | Размерность                                           |
|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Скорость поглощения $P_i$                                                  | $V_{up} = \frac{V_1 \cdot P_{ex}}{P_{ex} + K_1} \cdot \frac{Q_{P_i \max} - P_i}{Q_{P_i \max}}$                                                           | $\frac{\text{мкМ}}{10^{10} \text{кЛ} \cdot \text{ч}}$ |
| Удельная скорость роста культуры                                           | $\mu = \frac{V_2 \cdot (P_o - Q_{P_o \min})}{P_o - Q_{P_o \min} + K_2} \cdot (1 - \frac{C}{K_f})$                                                        | $\frac{1}{\text{ч}}$                                  |
| Скорость преобразования внутриклеточного $P_i$ в органические соединения Р | $V_p = \frac{V_3 \cdot (P_i - Q_{P_i \min})}{P_i - Q_{P_i \min} + K_3} \cdot \frac{Q_{P_o \max} - P}{Q_{P_o \max}}$                                      | $\frac{\text{мкМ}}{10^{10} \text{кЛ} \cdot \text{ч}}$ |
| Скорость образования $PolyP$                                               | $V_{syn} = \frac{V_5 \cdot (P_o - Q_{P_o \min})}{P_o - Q_{P_o \min} + K_5} \cdot \frac{Q_{PolyP \max} - PolyP}{Q_{PolyP \max}}$                          | $\frac{\text{мкМ}}{10^{10} \text{кЛ} \cdot \text{ч}}$ |
| Скорость гидролиза $PolyP$                                                 | $V_t = \frac{V_6 \cdot (PolyP - Q_{PolyP \min})}{PolyP - Q_{PolyP \min} + K_6} \cdot \frac{Q_{P_i \max} - P_i}{Q_{P_i \max}} \cdot \frac{R}{Q_{R \max}}$ | $\frac{\text{мкМ}}{10^{10} \text{кЛ} \cdot \text{ч}}$ |
| Скорость оттока $P_i$                                                      | $V_{eff} = \frac{V_7 \cdot (P_i - Q_{P_i \min})}{P_i - Q_{P_i \min} + K_7}$                                                                              | $\frac{\text{мкМ}}{10^{10} \text{кЛ} \cdot \text{ч}}$ |

Модель была параметризована путем оптимизации решений модели по экспериментальным кривым для всех пулов фосфата в условиях нормального роста, голодания и добавления избытка фосфата после периода голодания.

Исследование модели показало, что накопление полифосфатов критическим образом зависит от времени добавления фосфата после голодания культуры по фосфору (рис. 13).

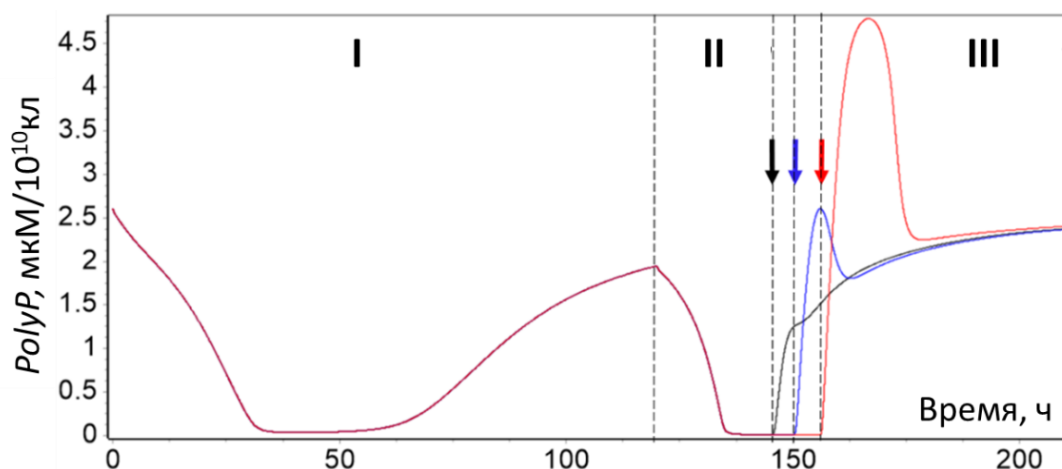


Рисунок 13 – Динамика пула полифосфатов *PolyP* во время роста культуры *Chlorella* в трехэтапном эксперименте. Клетки выращивали в среде, богатой фосфором, в течение 120 часов (I), а затем переносили в среду, обедненную фосфором (II). Избыток фосфата добавляли в среду через 20 часов (черная кривая и стрелка), 30 часов (синяя кривая и стрелка) или 36 часов (красная кривая и стрелка) после голодания (III).

Такой механизм реализуется за счет петли положительной обратной связи: уменьшение содержания фосфора в клетке  $P_i$  приводит к уменьшению синтеза регулятора  $R$ , что приводит к уменьшению скорости гидролиза ( $V_t$ ) полифосфатов *PolyP* и дальнейшему уменьшению  $P_i$ . Таким образом, если концентрация регулятора  $R$  снижается ниже определенного критического уровня, фосфатный обмен клетки переключается на альтернативный режим – накопление *PolyP*. В численных экспериментах было показано, что могут существовать два режима обмена фосфатов. Выбор между которыми определяется предысторией развития культуры клеток. Этим объясняется зависимость появления пика *PolyP* от периода голодания: при кратковременном голодании фосфорный обмен не успевает перейти в режим накопления *PolyP*.

Понимание динамики процессов при переходе клеток микроводорослей от фосфорного голодания к условиям, когда фосфора достаточно, является важным результатом и позволяет предложить метод двухэтапного культивирования. На первом этапе партию сточных вод обильно наполняют клетками водорослей, предварительно лишенными фосфора (например, в результате предыдущего

цикла очистки), до плотности, сравнимой с плотностью культуры в стационарной фазе. Нужно отметить, что голодание водорослей в среде, свободной от фосфора, должно быть достаточно продолжительным, чтобы исчерпать квоту клеточного фосфора. Когда уровень *PolyP* достигает пика, большая часть биомассы собирается для использования в качестве биоудобрений. Остальные клетки делятся до тех пор, пока в текущей партии сточных вод не истощится фосфор (второй этап). После истощения фосфора в обработанной партии большая часть очищенных сточных вод сбрасывается после сбора клеток микроводорослей, а оставшаяся культура инкубируется в отсутствие фосфора для получения инокулята, лишенного фосфора, для следующей партии сточных вод.

Таким образом, рассматриваемый переходный процесс на популяционном уровне – это регулируемый режим адаптации, в котором реализуется стратегия выживания и накопления целевых продуктов. Полученные результаты согласуются с концепцией многоуровневой организации переходных процессов и служат основой для разработки биотехнологических процессов с использованием микроводорослей.

*Основные результаты главы:*

1. Построена популяционная модель, демонстрирующая, как локальные метаболические переключения на уровне отдельной клетки обуславливают нелинейные, пороговые изменения в динамике всей культуры, что подтверждает иерархическую природу адаптационных переходов.
2. Полученное количественное описание динамики пулов фосфатов и роста культуры, позволяет прогнозировать поведение культуры при изменении условий.
3. Установлено, что накопление полифосфатов начинается на ранних стадиях стресса, до остановки роста, и связано с перераспределением метаболических потоков.

### **III. ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В диссертации на основе комплексного подхода, объединяющего биофизические эксперименты, математическое моделирование и системный анализ, исследована динамическая организация переходных процессов в клетках фотосинтезирующих организмов в норме и под действием стресса. С помощью разработанных математических моделей было обосновано, что переходные процессы являются этапами регуляции, определяющими стратегию адаптации клетки к изменяющимся условиям. Эти процессы отражают динамическую перестройку системы на различных иерархических уровнях – от элементарных стадий переноса электронов в фотосистеме II до перераспределения метаболических потоков, формирования пространственных паттернов мембранных переносчиков и роста клеточной популяции. Посредством переходных режимов реализуются многие защитные механизмы, включающие переключение на альтернативные пути электронного транспорта и активацию синтеза запасных веществ.

#### **Выводы по работе**

1. Разработанные на основе иерархического подхода редуцированные кинетические модели фотосистемы II (ФСII), позволяют количественно сопоставлять состояния ФСII с характерными фазами индукционной кривой в диапазоне от микросекунд до секунд. При этом сохраняется связь эффективных кинетических параметров модели с элементарными константами скоростей отдельных этапов переноса электронов посредством полученных в явном виде аналитических выражений.

2. С помощью редуцированной модели, детализирующей процессы на донорной стороне ФСII, выявлены две основные стадии переноса электронов в диапазоне сотен микросекунд, соответствующие фазам индукционной кривой: 1) разделение зарядов с последующим переносом электрона на  $Q_A$  (обобщенная константа этой стадии пропорциональна эффективному размеру антенны); 2) восстановление реакционного центра  $P_{680}$  за счет переноса электронов от кислород-выделяющего комплекса (КВК). Модель была применена для

количественной оценки гетерогенности реакционных центров ФСII в различных стрессовых условиях: при истощении азота в процессе роста *Chlorella* наблюдалось одновременное снижение доли  $\alpha$ -центров и активности КВК; под действием токсикантов (соли  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ) преобладало угнетение КВК; при изменении условий освещения у пяти различных видов водорослей выявлены индивидуальные различия ответов, свидетельствующие о видоспецифичной адаптации фотосинтетического аппарата. Выявленные изменения гетерогенности отражают адаптацию фотосинтезирующих клеток к условиям стресса.

3. Предложен и реализован метод спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации (СМЭА), обеспечивающий высокую чувствительность к ранним стадиям стресса, и позволяющий выявлять скрытые фазы в кривых индукции, не обнаруживаемые при визуальном анализе. Эффективность метода продемонстрирована на больших массивах ИК, полученных в условиях серного голодания для *Chlamydomonas* и азотного голодания для *Chlorella*. С помощью СМЭА выявлено раннее появление К-фазы с характерным временем в микросекундном диапазоне, отражающая изменения в КВК.

4. Предложена интегративная модель переходных процессов у *Chlamydomonas reinhardtii* при дефиците серы, объединяющая кинетическую модель электронного транспорта и потоковую модель центрального метаболизма. Показано, что при серном голодании переход в режим выделения водорода происходит за несколько минут на фоне постепенного (в течение нескольких дней) перестроения метаболизма, что свидетельствует о пороговом, триггерном характере переходного режима, управляемого редокс-состоянием пластохинонового пула. Такой режим обеспечивается нелинейной динамикой двойного протонирования первичного хинона ( $\text{Q}_\text{A}$ ) в условиях стресса. На длительных временах выявлено несколько этапов переключения метаболических потоков: на ранней стадии активируются альтернативные пути переноса электронов (хлородыхание), затем наблюдается переключение анаболических

процессов (синтез крахмала) на катаболические (гликолиз), обеспечивающее энергетическую поддержку клетки в условиях стресса.

5. С помощью разработанной модели трансмембранных процессов для гигантских клеток *Chara corallina* предложены механизмы генерации автоколебаний трансмембранного потенциала и pH, а также формирования чередующихся кислых и щелочных зон вдоль клеточной мембраны при изменении светового режима. Такие зоны представляют собой диссипативные структуры, возникновение которых является результатом гетерогенности в распределении активности протонной АТФазы в клеточной мембране.

6. Разработана модель роста *Chlorella vulgaris* в условиях фосфорного голодания, описывающая взаимосвязь между процессами поглощения фосфатов среды, накопления в клетке полифосфатов (*PolyP*), используемых в качестве фосфорсодержащих удобрений, и роста культуры. Обнаружен пороговый эффект при переходе к режиму накопления *PolyP*, зависящий от длительности периода голодания и реализующийся за счет механизма положительной обратной связи, между поглощением фосфата среды и фосфат-зависимым изменением скорости гидролиза *PolyP*.

7. Предложена двухстадийная стратегия культивирования *Chlorella vulgaris* в водоочистных сооружениях, заключающаяся в сочетании биологической очистки сточных вод и максимальном накоплении *PolyP*, и учитывающая динамические особенности процессов в голодающей по фосфору культуре. Показано, что эффективность такой стратегии определяется соблюдением критического временного интервала голодания: недостаточная продолжительность голодания не обеспечивает значимого синтеза *PolyP*, а превышение – может привести к необратимым нарушениям метаболических функций клетки.

8. Сформулирована концепция переходных процессов как регуляторных этапов, определяющих стратегию адаптации клетки. Показано, что переходные процессы на одном иерархическом уровне могут служить индикаторами динамических перестроек на других уровнях. Установлено, что

инициация переходных процессов зависит от небольшого числа ключевых управляющих параметров, изменения которых под действием стресса запускают перестройки процессов в клетке. Такой подход расширяет понимание динамической организации живых систем и открывает перспективы для биотехнологии и экологического мониторинга.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

*Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.8. Математическая биология, биоинформатика (физико-математические науки)*

1. Plyusnina T.Yu, Chervitsov R.N., Khrushchev S.S., Fursova P.V., Konyukhov I.V., Antal T.K., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. Dynamic response of photosystem ii in chlorella vulgaris to heavy metal stress: Integrated mathematical analysis // Russian Journal of Plant Physiology. – 2025. – vol. 72. – № 7. – P. 254. EDN: LRBMCS. Импакт-фактор 0,296 (SJR). 0,86/0,52 п.л.
2. Червицов Р.Н., Хрущев С.С., Фурсова П.В., Плюснина Т.Ю. Оценка гетерогенности комплексов фотосистемы II клеток водорослей *Chlorella vulgaris* в условиях азотного голодания с использованием математической модели // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. – 2025. – Т. 80. – № 3. – С. 190–196. EDN: SQAUGA. Импакт-фактор 0,443 (РИНЦ). 0,4/0,16 п.л.
3. Пирутин С.К., Шанк М.А., Цзя Ш., Конюхов И.В., Тодоренко Д.А., Червицов Р.Н., Фурсова П.В., Кабашникова Л.Ф., Плюснина Т.Ю., Хрущев С.С., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Комплексный анализ воздействия ионов меди на первичные процессы фотосинтеза *scenedesmus quadricauda* по результатам измерений флуоресценции хлорофилла а в суспензии и на одиночных клетках // Компьютерные исследования и моделирование. – 2025. – Т. 17. – № 2. – С. 293–322. EDN: AQYEGM. Импакт-фактор 0,187 (SJR). 1,73/0,26 п.л.
4. Дегтерева Н.С., Плюснина Т.Ю., Хрущев С.С., Червицов Р.Н., Воронова Е.Н., Яковлева О.В., Антал Т.К., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Оценка гетерогенности антенны и активности кислород-выделяющего комплекса фотосистемы II математическими методами // Биофизика. – 2024. – Т. 69. – № 3. – С. 486–497. EDN: OFUFTW. Импакт-фактор 0,593 (РИНЦ). 0,69/0,28 п.л.
5. Plyusnina T.Yu., Khrushev S.S., Degtereva N.S., Voronova E.N., Volgusheva A.A., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. Three-state mathematical model for the assessment of DCMU-treated photosystem II heterogeneity. // Photosynthesis Research. – 2024. – vol. 159. – № 2-3. – pp. 303–320. EDN: AZPOTO. Импакт-фактор 1,015 (SJR). 1,04/0,73 п.л.

6. Riznichenko G.Yu., Antal T.K., Belyaeva N.E., Khrushev S.S., Kovalenko I.B., Maslakov A.S., Plyusnina T.Yu., Fedorov V.A., Rubin A.B. Molecular, brownian, kinetic and stochastic models of the processes in photosynthetic membrane of green plants and microalgae // *Biophysical Reviews*. – 2022. – vol. 14. – № 4. – pp. 985–1004. EDN: YKIYYR. Импакт-фактор 1,048 (SJR). 1,15/0,17 п.л.
7. Ризниченко Г.Ю., Беляева Н.Е., Коваленко И.Б., Антал Т.К., Горячев С.Н., Маслаков А.С., Плюснина Т.Ю., Федоров В.А., Хрущев, С.С. Яковлева О.В., Рубин А.Б. Математическое моделирование электронного транспорта в первичных процессах фотосинтеза // *Биохимия*. – 2022. – Т. 87. – № 10. – С. 1350–1371. Импакт-фактор 1,86 (РИНЦ). 1,27 п.л.
8. Plyusnina T.Yu., Khrushev S.S., Fursova P.V., Solovchenko A.E., Antal T.K., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. Simulating the interplay between the uptake of inorganic phosphate and the cell phosphate metabolism under phosphorus feast and famine conditions in *chlorella vulgaris* // *Cells*. – 2021. – vol. 10. – № 12. – P. 3571. EDN: ENAZYV. Импакт-фактор 1,67 (SJR). 0,86/0,52 п.л.
9. Plyusnina T.Yu., Khrushev S.S., Degtereva N.S., Konyukhov I.V., Solovchenko A.E., Kouzmanova M., Goltsev V.N., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. Gradual changes in the photosynthetic apparatus triggered by nitrogen depletion during microalgae cultivation in photobioreactor. // *Photosynthetica*. – 2020. – vol. 58. – pp. 443–451. – Special issue. EDN: QANXSL. Импакт-фактор 0,504 (SJR). 0,52/0,21 п.л.
10. Ризниченко Г.Ю., Беляева Н.Е., Дьяконова А.Н., Коваленко И.Б., Маслаков А.С., Антал Т.К., Горячев С.Н., Плюснина Т.Ю., Федоров В.А., Хрущев С.С., Рубин А.Б. Модели фотосинтетического электронного транспорта. // *Биофизика*. – 2020. – Т. 65. – № 5. – С. 886–902. EDN: OJNJIE. Импакт-фактор 0,593 (РИНЦ). 0,98/0,15 п.л.
11. Плюснина Т.Ю., Хрущев С.С., Фролов А.Е., Дегтерева Н.С., Конюхов И.В., Погосян С.И., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Мониторинг фотосинтетической активности культуры микроводорослей *Chlorella* при истощении азота в среде // *Биофизика*. – 2019. – Т. 64. – № 3. – С. 468–477. EDN: YBTHSO. Импакт-фактор 0,593 (РИНЦ). 0,58/0,23 п.л.

12. Antal T., Konyukhov I., Volgusheva A., Plyusnina T., Khrushev S., Kukarskikh G., Goryachev S., Rubin A. Chlorophyll fluorescence induction and relaxation system for the continuous monitoring of photosynthetic capacity in photobioreactors // *Physiologia Plantarum*. – 2019. – vol. 165. – № 3. – pp. 476-486. EDN: AXNWAV. Импакт-фактор 1,291 (SJР). 0,63/0,09 п.л.
13. Плюснина Т.Ю., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Анализ распределения центральных метаболических потоков в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* в условиях серного голодания // *Биофизика*. – 2017. – Т. 62. – № 3. – С. 485–496. EDN: YMZDXR. Импакт-фактор 0,593 (РИНЦ). 0,69/0,48 п.л.
14. Плюснина Т.Ю., Хрущев С.С., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Анализ кинетики индукции флуоресценции хлорофилла с помощью спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации // *Биофизика*. – 2015. – Т. 60. – № 3. – С. 487–495. EDN: UAAWED. Импакт-фактор 0,593 (РИНЦ). 0,52/0,16 п.л.
15. Плюснина Т.Ю., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Регуляция электрон-транспортных путей в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* в условиях стресса // *Физиология растений*. – 2013. – Т. 60. – № 4. – С. 549–560. EDN: QAXJDD. Импакт-фактор 1,385 (РИНЦ). 0,69/0,48 п.л.
16. Postnikov E.B., Lavrova A.I., Kiseliov R.V., Plyusnina T.YU. Wavelet bifurcation analysis of dynamical systems: a case study in oscillations of *Chara corallina* transmembrane potential // *International Journal of Bifurcation and Chaos*. – 2012. – vol. 22. – № 12. – P. 1250293. EDN: RGHNPB. Импакт-фактор 0,596 (SJР). 0,81/0,12 п.л.
17. Плюснина Т.Ю., Воронова Е.Н., Гольцев В.Н., Погосян С.И., Яковлева О.В., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Редуцированная модель фотосистемы II для оценки характеристик фотосинтетического аппарата по данным индукции флуоресценции // *Компьютерные исследования и моделирование*. – 2012. – Т. 4. – № 4. – С. 943–958. EDN: PWOAET. Импакт-фактор 0,187 (SJР). 0,92/0,37 п.л.
18. Mogilevskaya E., Bagrova N., Plyusnina T., Gizzatkulov N., Metelkin E., Goryacheva E., Smirnov S., Kosinsky Y., Dorodnov A., Peskov K., Karelina T., Goryanin I., Demin O. Kinetic modeling as a tool to integrate multilevel dynamic

experimental data // Methods in molecular biology. – 2009. – vol. 563.– pp. 197–218. EDN: MXQWVP. Импакт-фактор 0,354 (SJР). 1,27/0,19 п.л.

19. Лаврова А.И., Плюснина Т.Ю., Украинец А.В., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Нелинейная динамика трансмембранного потенциала и рН в примембранной области клетки харовых водорослей // Компьютерные исследования и моделирование. – 2009. – Т. 1. – № 2. – С. 233–239. EDN: LABBWJ. Импакт-фактор 0,187 (SJР). 0,4/0,1 п.л.

20. Plyusnina T.Yu., Lavrova A.I., Price C.B., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. Nonlinear dynamics near the cell membrane of *Chara corallina* // Journal of Biological Systems. – 2008. – vol. 16. – № 2. – pp. 197–217. EDN: LKWURT. Импакт-фактор 0,487 (SJР). 1,21/0,85 п.л.

21. Лаврова А.И., Плюснина Т.Ю., Ризниченко Г.Ю. Переходные процессы и автоколебательные режимы вблизи мембраны клетки водоросли *Chara corallina* // Известия высших учебных заведений. Прикладная нелинейная динамика. – 2006. – Т. 14. – № 6. – С. 21–30. EDN: NYLORL. Импакт-фактор 0,616 (РИНЦ). 0,58/0,41 п.л.

22. Лаврова А.И., Плюснина Т.Ю., Булычев А.А., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Моделирование гистерезиса в распределении рН вблизи мембраны клетки водоросли *Chara corallina* // Биофизика. – 2005. – Т. 50. – № 6. – С. 1088–1094. EDN: HSHHFF. Импакт-фактор 0,593 (РИНЦ). 0,4/0,28 п.л.

23. Плюснина Т.Ю., Лаврова А.И., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Моделирование неоднородного распределения и колебаний трансмембранного потенциала и рН вблизи внешней стороны мембраны клетки водоросли *Chara corallina* // Биофизика. – 2005. – Т. 50. – № 3. – С. 492–499. EDN: HSEXAR. Импакт-фактор 0,593 (РИНЦ). 0,46/0,32 п.л.

24. Plusnina T.Yu., Lobanov A.I., Lavrova A.I., Starozhilova T.K., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. New spatiotemporal dynamics in a reaction-electrodiffusion model // Biophysics. – 2002. – vol. 47. – № 2. – pp. 277–282. EDN: MPLMZT Импакт-фактор 0,185 (SJР). 0,35/0,14 п.л.

25. Bulychев A.A., Polezhaev A.A., Zykov S.V., Pljusnina T.Yu., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B., Jantos W., Zykov V.S., Müller S.C. Light-triggered pH banding profile in *Chara* cells revealed with a scanning pH microprobe and its

relation to self-organization phenomena // Journal of Theoretical Biology. – 2001. – vol. 212. – № 3. – pp. 275–294. EDN: LGLQRN. Импакт-фактор 0,532 (SJР). 1,15/0,12 п.л.

### ***Главы в коллективных монографиях***

26. Ризниченко Г.Ю., Плюснина Т.Ю., Дьяконова А.Н., Коваленко И.Б., Хрущев С.С. Механизмы рН-регуляции электронных потоков в фотосинтетической цепи водородвыделяющих микроводорослей. Кинетические и многочастичные броуновские модели. // Физико-химические механизмы и регуляция процессов трансформации энергии в биологических структурах. – Москва-Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2017. – С. 420–443. 1,38/0,14 п.л.

<https://publications.hse.ru/books/211888784?ysclid=mn2278lgcc90687041>.

27. Плюснина Т.Ю., Лаврова А.И., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Роль протонной АТФ-азы в возникновении нелинейной динамики рН и электрического потенциала на клеточной мембране // Динамические модели процессов в клетках и субклеточных наноструктурах (под ред. Г.Ю. Ризниченко и А.Б. Рубина). – Москва-Ижевск: НИЦ Регуляция и хаотическая динамика: Институт компьютерных исследований, 2010. – С. 264–284. 1,21/0,48 п.л. <https://rucont.ru/efd/301519>.

28. Demin O.V., Lebedeva G.V., Kolupaev A.G., Mogilevskaya E.A., Plyusnina T.Yu., Lavrova A.I., Dubinsky A., Goryacheva E.A., Tobin F., Goryanin I.I. Kinetic modelling as a modern technology to explore and modify living cells // Modelling in Molecular Biology. Ciobanu, G., Rozenberg, G. (eds). – Berlin-Heidelberg: Natural Computing Series. Springer, 2004. – pp. 59–103. 2,59/0,26 п.л. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-18734-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-18734-6_4).