

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

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

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
доктора физико-математических наук

Научные консультанты:
доктор биологических наук, профессор, академик РАН
А.Б. Рубин,
доктор физико-математических наук, профессор
Г.Ю. Ризниченко

Москва – 2026

Оглавление

Список сокращений	5
Введение. Общая характеристика работы	6
Глава 1. Переходные процессы в биологических системах: иерархия, нелинейность и методы анализа	7
1.1. Концепция переходных процессов	18
1.2. Иерархическая организация биологических систем и временные шкалы переходных процессов	19
1.3. Фотосистема II как модельная иерархическая система для изучения переходных процессов	22
1.4. Развитие кинетических моделей фотосистемы II	24
1.5. Кривая индукции флуоресценции хлорофилла <i>a</i> – «подпись» фотосистемы II	27
1.6. Нелинейная динамика переходных режимов, наблюдаемая в экспериментах	31
1.7. Заключение к главе 1	35
Глава 2. Модели и методы анализа кривых индукции флуоресценции хлорофилла <i>a</i>, редуцированные модели и метод спектрального мультиэкспоненциального анализа (СМЭА)	36
2.1. Модель переноса электронов в ФСII	37
2.2. Иерархическая модель ФСII под действием DCMU для анализа гетерогенности антенны и кислород-выделяющего комплекса	46
2.3. Метод спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации (СМЭА) для анализа переходных процессов в ФСII по кривым индукции флуоресценции	63
2.4. Выводы по главе 2	67
Глава 3. Применение редуцированных моделей и метода СМЭА для анализа переходных процессов в условиях действия факторов стресса	69
3.1. Анализ переходных процессов в растущей культуре <i>Chlorella vulgaris</i> , при истощении азота в среде	69

3.2. Анализ переходных процессов в растущей культуре <i>Chlorella vulgaris</i> при действии токсикантов	82
3.3. Сравнение переходных процессов в ФСII водорослей, выращенных в различных световых условиях	98
3.4. Выводы по главе 3	106
Глава 4. Модели переходных процессов в клетках <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>, связанных с перестройкой метаболизма, в ответ на серное голодание	108
4.1. Модель переходных процессов в клетках <i>Chlamydomonas</i> при серном голодании	108
4.2. Анализ распределения центральных метаболических потоков в клетках <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> в условиях серного голодания	127
4.3. Выводы по главе 4	148
Глава 5. Модель переходных процессов у <i>Chara corallina</i> при изменении световых режимов	150
5.1. Формулировка модели зонообразования pH вдоль клеточной мембраны <i>Chara corallina</i>	151
5.2. Нелинейные режимы в локальной системе	159
5.3. Распределенная система	162
5.4. Модификация модели с учетом изменения pH цитоплазмы	164
5.5. Механизмы возникновения нелинейных режимов вблизи клеточной мембраны	169
5.6. Выводы по главе 5	171
Глава 6. Модель переходных процессов в популяции клеток <i>Chlorella vulgaris</i> в ответ на действие фосфорного голодания	174
6.1. Модели накопления полифосфата в клетке	175
6.2. Построение модели взаимопревращений пулов фосфатов в клетке	176
6.3. Экспериментальные данные, используемые для верификации модели	179
6.4. Динамика пулов фосфатов в клетках <i>Chlorella</i> в различных	

условиях роста	182
6.5. Модификация модели с учетом регуляции образования полифосфатов	185
6.6. Механизмы адаптации клеток <i>Chorella</i> к фосфорному голоданию	192
6.7. Применение в биотехнологии: накопление <i>PolyP</i> в биомассе клеток и очистка сточных вод	195
6.8. Выводы по главе 6	197
Обсуждение результатов	198
Заключение	202
Выводы по работе	203
Список литературы	206

Список основных сокращений

ФСII – фотосистема II

Q_A , Q_B – первичный и вторичный хиноны – переносчики электронов в ФСII

PQ, PQH₂ – пластохинон, восстановленный пластохинон

КВК – кислород-выделяющий комплекс

DCMU – 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина (диурон), ингибитор переноса электрона в Q_B -сайт ФСII

α -, β -центры – реакционные центры ФСII с разным размером светособирающей антенны (α – полная, β – только внутренняя)

ФСI – фотосистема I

Fd – ферредоксин

ИК – индукционная кривая (флуоресценции хлорофилла *a*)

ОЛР – фазы индукционной кривой: О (начало), J (~2 мс), I (~30 мс), Р (пик)

СМЭА – спектральная мультиэкспоненциальная аппроксимация

РТОХ – пластидная терминальная оксидаза

ndh – NADH-дегидрогеназа

FBA – flux balance analysis (метод анализа стационарных метаболических потоков)

PCA – principal component analysis (анализ главных компонент)

PolyP – полифосфат

P_i , P_o , P_{ex} – внутриклеточный неорганический фосфат, органические фосфорсодержащие соединения, внешний неорганический фосфат

ВВЕДЕНИЕ. 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. Все математические модели разработаны им самостоятельно; аналитические исследования (редукция по теореме Тихонова, анализ устойчивости, выявление точек бифуркации) выполнены лично автором. Численное моделирование и идентификация параметров по экспериментальным кривым проводились совместно со студентами и аспирантами, работающими под его руководством. Автор непосредственно участвовал в получении экспериментальных данных по индукции флуоресценции хлорофилла *a* (в частности, при азотном голодании); 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., 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), Пущино, 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 6th International Workshop on Deep Learning in Computational Physics, ОИЯИ, Дубна, Россия, 2022. XXII–XXIII Пущинские чтения по фотосинтезу, Пущино, 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. Пущино, 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. 7th International Conference. Photosynthesis Research for Sustainability-2016, Пущино, Московская область, Россия, 2016. VIII–XXXII Международных конференциях «Математика. Компьютер. Образование», Пущино, 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

У автора имеется 56 публикаций в рецензируемых научных изданиях. 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).

Глава 1. Переходные процессы в биологических системах: иерархия, нелинейность и методы анализа

1.1. Концепция переходных процессов

Переходные процессы – это универсальное явление, характерное для динамических систем любой природы. В технике, например в радиоэлектронике, переходный процесс определяется как временной интервал, в течение которого система переходит из одного установившегося состояния в другое после внешнего воздействия, такого как включение напряжения или изменение нагрузки. Эти процессы, как правило, описываются системами дифференциальных уравнений, а их анализ позволяет оценить устойчивость, быстродействие и качество регулирования. Возникающие характерные режимы, такие как затухающие колебания, пороговые переходы, гистерезис служат индикаторами внутренней структуры системы. Помимо характеристик устойчивых состояний системы важным является анализ именно переходного процесса, поскольку он дает ключ к пониманию скрытых свойств системы: инерционности, демпфирования, наличия обратных связей.

В биологии переходные процессы играют аналогичную, но более сложную роль. Они возникают при изменении внешних условий, включающем освещенность, температуру, доступность питательных веществ, и отражают адаптационную перестройку клетки. Переходный процесс в биологии можно определить как этап динамической перестройки биологической системы, сопровождающийся изменением ключевых параметров (концентраций метаболитов, активности ферментов, редокс-состояния переносчиков, уровня экспрессии генов), который продолжается до достижения нового стационарного состояния. В отличие от технических систем, биологические объекты обладают высокой степенью нелинейности, гетерогенности и иерархической организации, что делает анализ их переходных режимов особо сложной, но и чрезвычайно интересной задачей.

Жизнь биологической системы можно рассматривать как непрерывную цепь переходных процессов между квазистационарными состояниями. Развитие эмбриона, клеточный цикл, метаболические переключения, все эти фундаментальные процессы включают в себя динамические этапы, которые не сводятся к простой смене состояний. Именно в переходных режимах реализуются ключевые стратегии, активируется тот или иной сигнальный путь, запускается программа ответа на стресс, происходит перераспределение энергетических и метаболических потоков. Понимание этих процессов в фотосинтезирующих организмах позволяет не только описывать, но и предсказывать и управлять поведением таких систем, что может иметь большое значение в биотехнологии, сельском хозяйстве и экологическом мониторинге.

1.2. Иерархическая организация биологических систем и временные шкалы переходных процессов

Ключевой особенностью биологических систем является их иерархическая организация, при которой процессы на разных уровнях (молекулярном, субклеточном, клеточном, популяционном) протекают в различных временных диапазонах: поглощение света и перенос электронов в фотосистемах происходят за нано- и микросекунды (молекулярный уровень), ферментативные реакции протекают за миллисекунды (субклеточный уровень), перестройка экспрессии генов осуществляется за минуты, на рост клетки уходят часы и дни (уровень целостного организма).

Такая временная иерархия отражает динамическую организацию процессов и определяет стратегию их анализа. Макроскопические медленные процессы (например, изменение роста культуры в течение дней) включают в себя множество быстрых субклеточных процессов, которые зачастую невозможно напрямую наблюдать. Однако, как показывает практика, динамика «быстрых» процессов может служить индикатором «медленных» перестроек. Например, изменения в кривой индукции флуоресценции хлорофилла *a*, регистрируемой за секунды, могут предвосхищать метаболические перестройки, завершающиеся через часы.

Важным аспектом анализа таких систем является выявление узких мест, критических точек или компонентов, чьи динамические характеристики лимитируют поведение всей системы. Эти узкие места часто локализованы на промежуточных уровнях иерархии (например, транспорт веществ через мембраны или активация ключевых регуляторных белков), и их учет позволяет значительно упростить моделирование и прогнозирование поведения системы в целом, связывая быстрые молекулярные события с медленными фенотипическими изменениями.

Кроме того, следует учитывать, что гомеостаз, характеризующий состояние относительного динамического равновесия, может быть достигнут на одном уровне организации и отсутствовать на другом. Например, на молекулярном уровне может наблюдаться стабильность концентраций ключевых метаболитов, в то время как на клеточном уровне идет активная перестройка экспрессии генов или изменяется темп деления. Это несоответствие между уровнями отражает не столько нарушение функции, сколько динамическую природу биологической адаптации: система может находиться в переходном состоянии на одном уровне, сохраняя устойчивость на другом. Такие асинхронные переходные процессы указывают на то, что гомеостаз не является каким-то универсальным свойством всей системы, а характеризует скорее определенный уровень иерархии. Именно анализ этих дисбалансов между иерархическими уровнями позволяет глубже понять механизмы адаптации, стрессовых ответов и эволюционной устойчивости биологических систем.

Иерархичность также позволяет применять методы разделения временных масштабов, в частности, теорему Тихонова о «быстрых» и «медленных» переменных [Тихонов 1948]. Согласно этой теореме, если в системе существуют сильно различающиеся по скорости процессы, то «быстрые» переменные успевают достичь квазистационарного состояния гораздо раньше, чем «медленные» переменные, тогда «быстрые» переменные можно исключить из системы дифференциальных уравнений, заменив алгебраическими

соотношениями. Это позволяет редуцировать сложные модели до более простых, описывающих макроскопическую динамику.

Однако, в отличие от классического подхода, как, например, при выводе уравнения Михаэлиса–Ментен, где после редукции элементарные константы «забываются», и анализ ограничивается эффективными параметрами ($V_{\max}$, K_M), в нашем подходе редукция является не концом анализа, а скорее его началом. Полученные в редуцированной модели эффективные кинетические константы рассматриваются как интегральные характеристики, которые включают в себя вклад элементарных процессов. При изменении условий, например, при стрессе, мы можем «развернуть» эти эффективные константы, анализируя, какие именно элементарные стадии (например, разделение зарядов в реакционном центре фотосистемы II, перенос электрона от кислород-выделяющего комплекса или перенос электрона на первичный хинон) изменились. Это позволяет установить связь между наблюдаемыми макроскопическими изменениями и процессами на молекулярном уровне.

Такой подход лежит в основе интегративного метода анализа биологических систем, который объединяет данные с разных уровней организации, от молекулярной динамики до физиологических ответов, и позволяет интерпретировать динамические события как ответ целостной системы. Интегративность заключается в том, что при сопоставлении данных с разных уровней организации выявляются причинно-следственные связи между процессами на этих уровнях, то есть, изменения на одном уровне коррелируют с изменениями на другом и объясняются через них. В этом контексте эффективные константы в редуцированных моделях являются не просто подгоночными параметрами, а индикаторами состояния подсистемы, чувствительными к перестройкам в более быстрых процессах.

Важно понимать, что быстрые процессы, хотя и достигают квазиравновесия, их кинетические константы могут изменяться под действием внешних и внутренних факторов, например, при изменении температуры, pH, уровня освещенности или при повреждении белковых комплексов. Эти

изменения, даже если они происходят на наносекундной шкале, накапливаются и транслируются в макроскопические эффекты через перестройку эффективных параметров. Так, снижение скорости переноса электрона в фотосистеме II может изменить эффективный коэффициент квантового выхода, что в итоге приведет к замедлению роста клетки через часы или дни. Таким образом, быстрые процессы могут играть роль «сенсоров» и «модуляторов» медленной динамики, а их изменение может инициировать каскад адаптивных реакций на более высоких уровнях.

Нужно также учитывать, что обратная связь от медленных процессов может влиять на быстрые, например, долгосрочная экспозиция к стрессу может привести к изменению экспрессии генов, кодирующих компоненты фотосистем, что, в свою очередь, изменит состав и стехиометрию белковых комплексов и повлияет на кинетику первичных фотохимических реакций. Это означает, что иерархия не является жесткой и односторонней, между уровнями существуют обратные связи и взаимная регуляция, что делает систему динамически гибкой, но и сложной для анализа.

Именно поэтому интегративный метод требует последовательного рассмотрения разных масштабов, от макроуровня к микроуровню и обратно, сначала упрощаем систему, выделяя ключевые макропараметры, затем «распаковываем» их, чтобы понять молекулярную основу изменений, и, наконец, возвращаемся к макроскопическому уровню с уточненной моделью. Такой подход позволяет не только объяснять наблюдаемые явления, но и предсказывать поведение системы в новых условиях, выявляя возможные уязвимые места и механизмы устойчивости. В конечном итоге, интегративный анализ раскрывает биологическую систему как единое динамическое целое, где временные масштабы, уровни организации и механизмы регуляции тесно переплетены.

1.3. Фотосистема II как модельная иерархическая система для изучения переходных процессов

Фотосистему II (ФСII) можно назвать идеальной модельной системой для изучения переходных процессов в живых клетках (рис. 1.1). Ее первичные

реакции, поглощение света, разделение заряда, перенос электрона, фотолиз воды, протекают в строго упорядоченной последовательности, образуют иерархию по временным масштабам: от пикосекунд до сотен секунд и могут быть зарегистрированы с высоким временным разрешением в экспериментах [Kalaji et al 2016]. При этом ФСII обладает высокой чувствительностью к внешним воздействиям, что делает ее биоиндикатором состояния растительной клетки [Khan et al 2025].

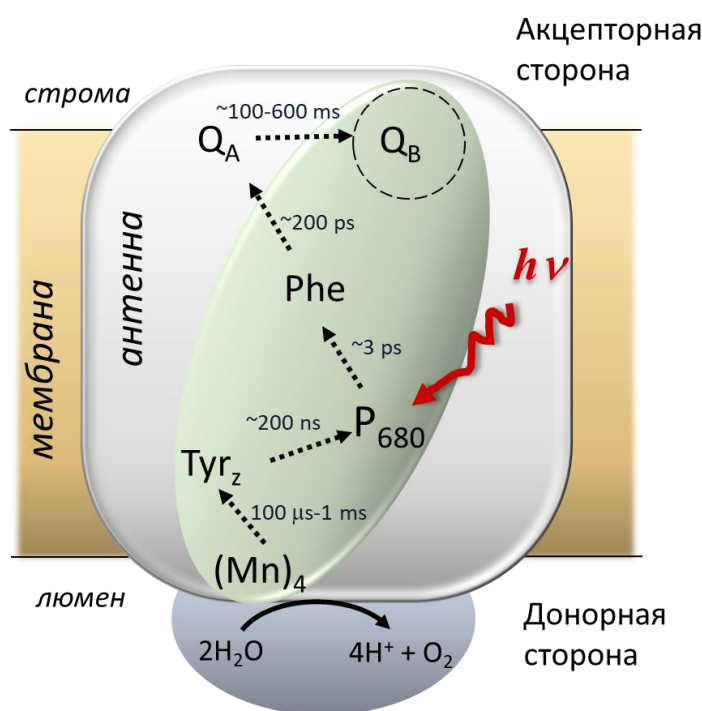


Рисунок 1.1 – Схематическое изображение комплекса фотосистемы II. Элементы ФСII: $(Mn)_4$ – кислород-выделяющий комплекс (марганцевый кластер); Tyr_Z – тирозин-Z; P_{680} – димер хлорофилла a ; Phe – феофитин; Q_A – первичный хинон, Q_B – вторичный хинон. Сплошной стрелкой показана реакция окисления воды, пунктирными стрелками – транспорт электрона.

Кроме того, ФСII чрезвычайно удобна для экспериментального анализа благодаря быстрой и однозначной ответной реакции на внешний стимул – свет. В отличие от многих биохимических процессов, где измерение скоростей ферментативных реакций требует длительной инкубации, сложной подготовки проб и косвенных методов детекции, ответ ФСII на световой импульс регистрируется в реальном времени за нано- микро- и мили-секунды с помощью методов быстрой спектроскопии и флуориметрии. Это позволяет напрямую

наблюдать динамику первичных фотохимических событий без значительных временных задержек или накопления метаболитов.

Такие характеристики делают ФСII особенно ценной для исследования ранних этапов клеточной реакции на стресс, когда медленные ферментативные процессы еще не успевают проявиться. Например, после изменения внешних условий: освещенности, температуры, действия токсикантов и.т.п. за 1 секунду (время измерения кривой индукции флуоресценции хлорофилла *a*) можно зафиксировать изменения в кинетике переноса электронов или эффективности кислородвыделяющего комплекса, которые отражаются в изменении характеристик этой кривой. Эти данные предоставляют оперативную информацию о функциональном состоянии фотосинтетического аппарата, тогда как оценка скорости ферментативных реакций (например, активности Рубиско) требует извлечения белков, подготовки экстрактов и может отражать лишь усредненный по времени результат, не улавливая быстрых переходных состояний.

Таким образом, высокая временная разрешающая способность и прямая детектируемость светозависимых процессов делают ФСII не только чувствительным биоиндикатором, но и мощным инструментом для изучения динамики клеточных ответов в режиме, недоступном для большинства других биохимических систем.

1.4. Развитие кинетических моделей фотосистемы II

Математическое моделирование первичных процессов фотосинтеза, и, в частности, процессов в ФСII, является важным направлением биофизики, активно развиваемым на протяжении последних пятидесяти лет. Этот путь от простых феноменологических схем к детальным кинетическим моделям отражает эволюцию системного подхода к изучению биологических систем и тесно связан с развитием экспериментальных методов, особенно регистрации переменной флуоресценции хлорофилла *a*.

Первые модели ФСII описывали процессы в отдельных фотосинтетических реакционных центрах [Stirbet, Strasser 1996; Stirbet et al., 1998; Strasser, Stirbet,

2001; Lazar, 2001, 2003; Zhu et al., 2005]. Одной из ранних работ, заложивших основу кинетического подхода, стала модель авторов [Schatz et al. 1988], в которой впервые была предложена количественная оценка энергетических и кинетических параметров первичных реакций. Эти модели, хотя и относительно простые, уже учитывали конкуренцию между фотохимическим переносом электрона и процессами релаксации энергии, включая флуоресценцию и безызлучательную рекомбинацию.

В 1980-х годах на кафедре биофизики биологического факультета МГУ под руководством А.Б. Рубина и Г.Ю. Ризниченко был начат цикл работ по построению кинетических моделей электронного транспорта в фотосистемах. Были предложены оригинальные схемы, описывающие динамику состояний переносчиков в ФСІ и ФСІІ. В последующие десятилетия эти модели были существенно развиты, в работах [Rubin, Riznichenko 2009, 2014], [Belyaeva et al. 2008, 2011, 2014] были построены детальные кинетические схемы, учитывающие множество состояний реакционного центра, включая различные окислительно-восстановительные состояния кислород-выделяющего комплекса (КВК), тирозина Z, P₆₈₀ и первичного и вторичного хинонов, Q_A и Q_B. Особое значение имели исследования, в которых с помощью кинетических моделей выполнялось аппроксимация экспериментальных кривых индукции флуоресценции с помощью модельных кривых. Так, на основе модели изолированной ФСІІ было проведено количественное воспроизведение кинетики флуоресценции в клетках зеленой водоросли *Chlorella pyrenoidosa*, а также в листьях *Arabidopsis thaliana* и шпината [Belyaeva et al., Photosyn. Res., 2008, 2011, 2014]. Модель позволяла не только описать форму кривой, но и оценить значения кинетических констант, недоступные для прямого измерения в эксперименте. Например, было показано, что при увеличении интенсивности света возрастает константа безызлучательной рекомбинации в реакционном центре, а вклад энергетических потерь через безызлучательную релаксацию в реакционном центре может достигать 30% от поглощенного кванта света. Этот результат подчеркивает

важность моделирования как инструмента для выявления механизмов регуляции процессов в ФСII.

Современные математические модели ФСII можно условно разделить на два типа: детальные и упрощенные, каждая из которых решает свои задачи в рамках системного анализа первичных процессов фотосинтеза. Большинство существующих моделей использует аппарат обыкновенных дифференциальных уравнений [Belyaeva et al. 2016, 2019; Stirbet et al. 2014; Lazar et al. 2003; Ebenhof et al. 2011; Vershubskii et al 2018; Tikhonov, Vershubskii 2020], хотя имеются и альтернативные подходы, использующие стохастические методы, в частности «rule-based» Монте-Карло моделирование [Zhu et al. 2005; Antal et al., 2018].

Детальные модели описывают сложную сеть переходов между состояниями ФСII, включая от 30 до 50 переменных, и учитывают такие процессы, как разделение зарядов в реакционном центре ФСII, транспорт электронов между различными переносчиками, процессы рекомбинации [Strasser et al., 2001; Lazar, 2003; Zhu et al., 2005; Belyaeva et al., 2011]. Эти модели позволяют детально исследовать механизмы регуляции фотосинтетических процессов в различных условиях и широко используются для фундаментальных исследований. Они эффективны при решении прямых задач – воспроизведения формы кривой индукции или затухания флуоресценции хлорофилла *a* и ее изменения при изменении параметров системы. Однако при решении обратных задач, определении параметров модели по экспериментальным данным, может возникнуть неоднозначность, поскольку схожие изменения формы кривой могут быть вызваны различными комбинациями измененных констант.

Упрощенные модели, напротив, описывают динамику системы с помощью небольшого числа феноменологически полученных дифференциальных уравнений и параметров [Baake, Schloder 1992; Goltsev, Yordanov 1997; Chernev et al. 2006; Vredenberg, Prasil 2009]. Такие модели оказываются удобными для автоматизированного анализа данных в биотехнологии и экологическом мониторинге. Они позволяют эффективно решать обратные задачи, определять параметры системы по экспериментальным данным, однако интерпретация этих

параметров ограничена рамками принятых упрощений и не всегда может быть однозначно сопоставлена с конкретными биофизическими процессами.

Возникает необходимость преодолеть фундаментальное противоречие между детальными и упрощенными моделями: с одной стороны, детальные модели содержат богатую физическую основу, но затрудняют анализ экспериментальных данных из-за неоднозначности решения обратной задачи; с другой стороны, редуцированные модели позволяют эффективно обрабатывать данные, но теряют связь с элементарными процессами.

Ключевой задачей становится создание такого подхода, включающего последовательную редукцию модели на основе иерархии времен, при котором редукция модели не становится конечной целью, а предполагает дальнейшую интерпретацию. В этом контексте эффективные кинетические константы, полученные в редуцированной модели, должны рассматриваться не как формальные параметры, а как интегральные характеристики, отражающие совокупный вклад элементарных стадий, таких как образование возбужденного состояния пигмента, перенос электрона от кислород-выделяющего комплекса (КВК) или разделение заряда в реакционном центре. При изменении внешних условий (например, под действием стресса) анализ изменений в эффективных константах позволит предположить, какие именно элементарные стадии претерпели перестройку. При таком подходе математическая модель становится инструментом, который можно использовать для экспресс-анализа динамики флуоресценции и последующей оценки по этой динамике состояния отдельных компонентов ФСII и предсказания их поведения в новых условиях.

1.5. Кривая индукции флуоресценции хлорофилла *a* – «подпись» фотосистемы II

Одним из наиболее информативных и доступных методов исследования состояния ФСII является регистрация кривой индукции флуоресценции хлорофилла *a*. Флуоресценция представляет собой процесс, конкурирующий с фотохимическим переносом электронов, поэтому ее динамика напрямую отражает активность первичных реакций фотосинтеза и может служить

чувствительным индикатором функционального состояния фотосинтетического аппарата. При освещении темноадаптированного образца интенсивность флуоресценции возрастает от минимального уровня F_0 (соответствующего полностью окисленному первичному хинону Q_A) до максимального уровня F_m (при полном его восстановлении), проходя через характерные фазы O, J, I, P – так называемую OJIP-кривую [Strasser et al. 2004] (рис. 1.2).

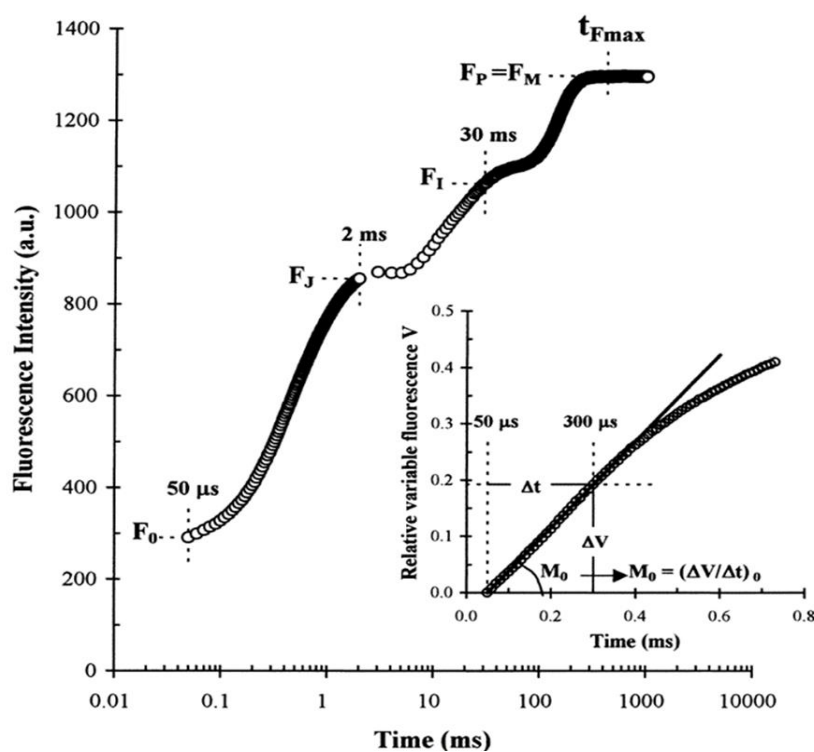


Рисунок 1.2 – Пример кривой индукции флуоресценции хлорофилла *a*, измеренной в относительных единицах. [Strasser et al. 2004]. Значения флуоресценции F_0 , F_J , F_I , F_P соответствуют фазам O, J, I, P.

Эти фазы отражают последовательные этапы электронного транспорта: накопление восстановленного Q_A (фаза O–J), восстановление пула пластохинонов (фаза J–I) и процессы, связанные с фотосистемой I и редокс-статусом переносчиков (фаза I–P). Форма кривой зависит от множества факторов: состояния реакционных центров, активности кислород-выделяющего комплекса (КВК), структуры и подвижности антенного комплекса, а также редокс-статуса электронных переносчиков. Любое изменение внешних условий, минеральное голодание, действие токсикантов, температурный стресс, вызывает изменение формы OJIP-кривой. Из-за высокой чувствительности и

специфичности изменений формы OJIP-кривой в ответ на различные внешние воздействия, эта кривая была названа «подписью фотосинтеза» («signature of photosynthesis») [Strasser et al. 2004], что подчеркивает ее уникальную информативность как индикатора функционального состояния фотосинтетического аппарата и делает полезным инструментом для диагностики стрессовых состояний [Kalaji et al. 2014, 2016].

Для количественного анализа кривой Р. Штрассером и соавторами был разработан так называемый JIP-тест, основанный на теории энергетических потоков [Strasser et al. 2004]. Этот метод позволяет рассчитать ряд феноменологических параметров, таких как квантовый выход первичной фотохимии (F_v/F_m), индекс производительности (PI) и долю Q_v -невосстанавливающих центров (V_J), по значениям флуоресценции в фиксированные моменты времени. Благодаря своей простоте и стандартизованности, JIP-тест нашел широкое применение в физиологии растений и экологическом мониторинге, его используют для выявления ранних признаков деградации и адаптационных реакций, вызванных абиотическими факторами, такими как засуха, температура, солевой стресс и дефицит питательных веществ [Oukarroum et al. 2009; Cetner et al. 2017]. JIP-тест активно применяется для мониторинга эффективности фотосинтеза в исследованиях генетической варибельности адаптационных механизмов под воздействием различных стрессоров [Rapacz et al. 2019], а также в биотехнологических подходах по улучшению устойчивости культурных растений [Chang et al. 2025]. Современные исследования сочетают JIP-тест с методами машинного обучения и искусственного интеллекта для автоматизированного и более точного анализа фотосинтетических параметров [Chang et al. 2025]. Кроме того, JIP-тест используется для оценки воздействия наноматериалов и микроэлементов на фотосистему, что расширяет его применение в экотоксикологии и агроэкологии [Raihan et al. 2025]. Однако возможности JIP-теста существенно ограничены. Во-первых, он предполагает фиксированные временные точки для отсчета фаз (например, 2 мс для J-точки), в то время как характерные времена переходов

зависят от вида организма, условий культивирования и интенсивности света. Во-вторых, метод не позволяет напрямую оценить скорости отдельных стадий переноса электронов или выявить молекулярные механизмы, лежащие в основе наблюдаемых изменений. В частности, ЛР-тест не дает ответа на вопрос, какие именно состояния ФСII реализуются в стрессовых условиях или как изменяется гетерогенность реакционных центров.

Таким образом, хотя ЛР-тест остается полезным инструментом для экспресс-оценки общего состояния фотосинтетического аппарата, он не обеспечивает достаточной детализации для анализа переходных процессов на молекулярном уровне.

Это обуславливает необходимость разработки и применения более гибких подходов, позволяющих не только описывать форму кривой, но и восстанавливать динамику отдельных стадий и связывать их с конкретными изменениями в ФСII.

Важно отметить, что ФСII не является изолированной системой: ее состояние влияет на весь метаболизм клетки, а ее динамика отражает изменения в клеточных компартментах: хлоропластах, митохондриях, цитоплазме. Например, при серном голодании у *Chlamydomonas* снижение активности ФСII сопровождается активацией антиоксидантной защиты и переключением на метаболизм, ведущий к накоплению липидов и выделению водорода [Antal et al. 2003, 2007, 2011]. При этом изменения на кривой индукции флуоресценции предшествуют изменениям в метаболизме и росте культуры, что подчеркивает раннюю сигнальную роль ФСII. Изучение переходных процессов в ФСII позволяет не только понять ее собственную динамику, но и раскрыть принципы регуляции многих процессов клетки. Именно поэтому в данной работе разрабатываемые модели ФСII рассматриваются как важный инструмент анализа наблюдаемых в экспериментах переходных процессов.

1.6. Нелинейная динамика переходных режимов, наблюдаемая в экспериментах

Еще одной фундаментальной чертой биологических систем является их нелинейная организация. Большинство биохимических реакций подчиняются нелинейным кинетическим законам, включают положительные и отрицательные обратные связи. Это приводит к появлению сложных динамических режимов: бистабильности, гистерезиса, автоколебаний, квази-хаотичности. Такие режимы обеспечивают быстрый отклик системы на внешние воздействия и играют важную роль в повышении устойчивости, позволяя системе «выбирать» между альтернативными состояниями. Переход между режимами часто управляется небольшим числом ключевых параметров, чьи изменения могут запустить каскадную перестройку всей системы. К ним относятся, например, редокс-состояние пластохинонового пула, трансмембранный протонный градиент (ΔpH), соотношение NADPH/ATP, уровень активных реакционных центров ФСII, концентрация сигнальных молекул (Ca^{2+} , ROS) и т.п. Изменение этих параметров регулирует включение механизмов, определяющих направление и характер адаптации.

Так, при дефиците серы у *Chlamydomonas reinhardtii* экспериментально наблюдается резкое снижение переменной флуоресценции (рис.1.3), что указывает на снижение эффективности фотосинтетического аппарата [Antal et al 2003, 2007, 2011]. Эти изменения сопровождаются активацией выделения водорода, которое начинается через 24–48 часов после начала голодания и достигает максимума к 70–80 часу [Antal et al. 2003, 2007, 2011]. Кинетика этого процесса не является плавной, на кривых роста культуры и индукции флуоресценции наблюдаются пороговые переходы, что может указывать на наличие триггерных механизмов.

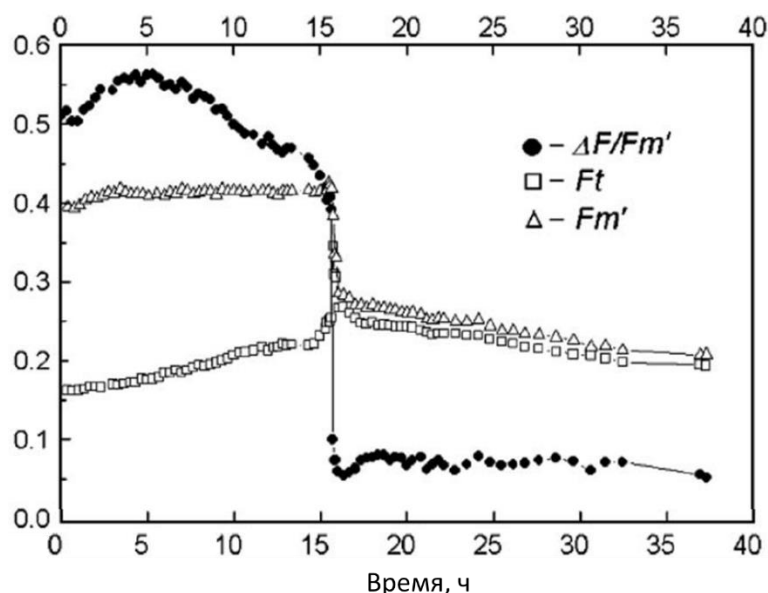


Рисунок 1.3 – Изменение во времени ряда физиологических параметров в клетках *C. reinhardtii* во время инкубации в условиях дефицита серы. [Antal et al. 2003].

Аналогичные пороговые эффекты могут наблюдаться при азотном голодании у *Chlorella vulgaris* [Plyusnina et al. 2020]. Здесь также отмечается снижение F_v/F_m , что связывают с разборкой светособирающих комплексов и снижением количества активных реакционных центров. Анализ кривых индукции с помощью разработанного нами метода спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации (СМЭА), представленного в следующей главе, показывает, что на кривых индукции флуоресценции появляются новые фазы, которые могут служить ранними маркерами стресса и предшествуют видимому замедлению роста [Plyusnina et al 2020].

Другим примером нелинейных переходных процессов в биологических системах является динамика поглощения фосфата и накопления полифосфатов (*PolyP*) у водорослей *Chlorella vulgaris*. Эти процессы демонстрируют сложную динамику, зависящую не только от текущих условий среды, но и от предыстории клетки, что делает их классическим проявлением гистерезиса – одного из ключевых признаков нелинейных систем. После периода голодания при восполнении фосфата в среде клетки *Chlorella* проявляют выраженный ответ накопления *PolyP*, их содержание быстро возрастает до максимума, после чего

начинает снижаться по мере включения фосфата в структурные компоненты клетки и роста культуры [Aitchison, Butt 1973; Solovchenko et al. 2019]. Этот режим контрастирует с поведением клеток, выращенных в условиях постоянного избытка питательных веществ, в этом случае содержание *PolyP* сначала уменьшается на начальных стадиях роста, а лишь спустя 1–2 дня начинает постепенно увеличиваться [Aitchison, Butt 1973; Solovchenko et al. 2019]. Такая разнонаправленность кинетического поведения указывает на то, что клетка реализует разные регуляторные стратегии в зависимости от предшествующих условий роста, что является проявлением памяти системы.

Клетки гигантских водорослей рода *Chara* представляют собой уникальную модельную систему для изучения сложных динамических процессов в живых клетках. Их вытянутые клетки длиной до 10 см сочетают в себе множество фундаментальных биологических свойств: электрическую возбудимость мембраны, пространственно-временную организацию фотосинтетического аппарата и способность к светиндуцированному формированию устойчивых паттернов pH, так называемые «pH-зоны» (рис.1.4.), и потенциала вдоль клеточной мембраны.

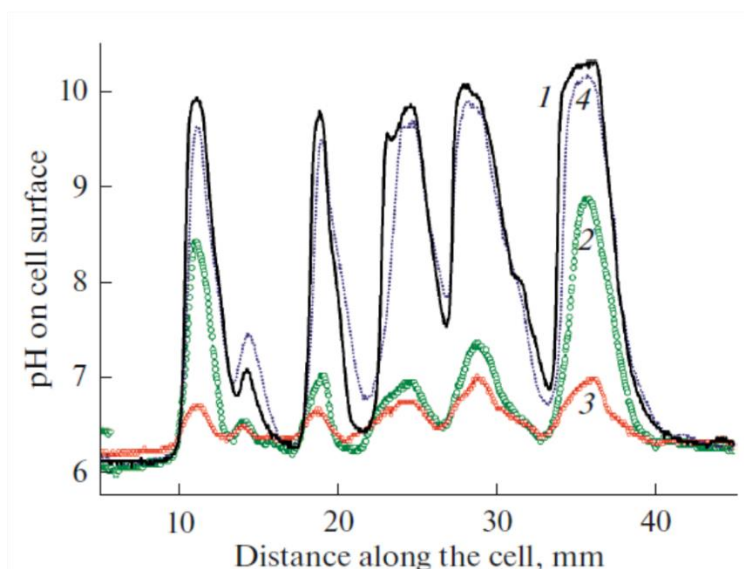


Рисунок 1.4 — Светозависимый профиль pH в приклеточных слоях среды вдоль междоузлий клетки *Chara*. Профили pH в покое (сплошная кривая 1) и через 2, 9 и 45 мин после генерации потенциала действия (кривые 2–4 соответственно). [Bulychev, Krupenina 2024].

Эти особенности делают клетки *Chara* очень удобным объектом для анализа переходных процессов, проявляющихся на разных уровнях организации, от молекулярных событий переноса ионов через мембрану посредством H^+ -АТФазы до образования макроскопических диссипативных структур вдоль клеточной мембраны. При равномерном освещении на клеточной мембране формируются области с различным значением pH, что связано с локальной активностью плазматической H^+ -АТФазы и транспортом ионов через мембрану [Bulychev, Krupenina 2024, Bulychev, Strelets 2024]. Эти структуры являются классическим примером диссипативных структур, возникающих в открытых неравновесных системах за счет самоорганизации. Их формирование и устойчивость зависят от баланса между энергией, поступающей от света, и скоростью диффузии ионов в примембранном слое.

Особый интерес представляет гистерезис в распределении pH-зон, обнаруженный при изменении освещенности [Bulychev et al 2003]. При увеличении светового потока pH-полосы формируются при одной критической интенсивности, а при уменьшении – исчезают при более низкой. Это свидетельствует о памяти системы, о существовании метастабильных состояний и механизмах переключения, характерных для бистабильных систем. Гистерезис позволяет клетке сохранять оптимальную конфигурацию (например, оптимальное распределение зон поглощения CO_2) даже после кратковременного затенения, что может рассматриваться как элемент клеточной стратегии устойчивости.

Таким образом, можно заключить, что наблюдаемые макроскопические изменения являются следствием нелинейных переходов, управляемых небольшим числом ключевых параметров. Анализ переходных процессов позволяет не только описывать эти изменения, но и восстанавливать молекулярные механизмы, лежащие в их основе.

Все модели, представленные в диссертации, построены на основе экспериментально наблюдаемых переходных процессов, которые были зафиксированы в различных фотосинтезирующих организмах при действии

стрессовых факторов. Эти данные легли в основу разработки редуцированных кинетических моделей и метода спектрального мультиэкспоненциального анализа (СМЭА). Таким образом, каждая модель в диссертации строится на основе конкретного экспериментального факта, ее цель – раскрыть механизм переходного процесса, связав наблюдаемую динамику с молекулярными и метаболическими перестройками.

1.7. Заключение к главе 1

Анализ переходных процессов в фотосинтезирующих организмах требует системного подхода, объединяющего биофизику, математическое моделирование и системную биологию. Иерархическая организация и нелинейная динамика определяют структуру этих процессов. Методы редукции моделей по Тихонову позволяют упростить анализ, но при этом сохраняется возможность «разворачивания» эффективных параметров для выяснения молекулярных механизмов. Переходные процессы на одном уровне могут служить индикаторами перестроек на других, что делает их мощным инструментом для диагностики состояния клетки. В последующих главах будут представлены конкретные модели и их применение для анализа ответа растительных клеток на стресс.

Глава 2. Модели и методы анализа кривых индукции флуоресценции хлорофилла *a*, редуцированные модели и метод спектрального мультиэкспоненциального анализа (СМЭА)

Переходные процессы, возникающие в клетках фотосинтетических организмов при изменении светового режима или под действием стрессовых факторов, представляют собой отражение сложной, многоуровневой перестройки, охватывающей как молекулярные, субклеточные системы, так и целостные клетки. Фотосистема II (ФСII) – ключевой компонент фотосинтетического аппарата, динамика которого в первые моменты после включения света несет информацию о функциональном состоянии клетки. Кривая индукции флуоресценции хлорофилла *a*, или OJIP-кривая, служит мощным неинвазивным инструментом для регистрации этих процессов, поскольку ее форма напрямую зависит от состояния реакционных центров, скорости переноса электронов и эффективности фотохимических реакций. Однако для глубокого понимания механизмов, лежащих в основе наблюдаемой динамики, требуется подход, способный связать макроскопически регистрируемую кинетику с элементарными биофизическими событиями.

В данной главе реализуется подход, основанный на принципах иерархической организации. Первичные фотохимические реакции в ФСII характеризуются резко различающимися временными масштабами: от нано- и пикосекунд – поглощение квантов света и разделение зарядов в реакционном центре до микро- и миллисекунд – передача электрона в цепи электронного транспорта. Эта временная иерархия лежит в основе применяемых в данной главе методов моделирования, в частности, методов редукции сложных кинетических схем. Так, предположения о квазиравновесии и квазистационарности позволяют исключить из анализа быстро устанавливающиеся состояния, заменив их алгебраическими соотношениями. В результате формируется редуцированная модель, описывающая макроскопическую динамику, но при этом сохраняется возможность «разворачивания» ее эффективных параметров для выявления изменений на

уровне отдельных элементарных стадий, таких как перенос электрона, рекомбинация зарядов или активность кислород-выделяющего комплекса (КВК).

В рамках главы представлены две взаимодополняющие модели, иллюстрирующие разные аспекты применения этого подхода. Первая модель демонстрирует реализацию принципа квазиравновесия и используется для анализа кривых индукции флуоресценции у разных фотосинтетических организмов – высших растений (фасоль) и одноклеточной водоросли *Chlorella*. Сравнение параметров редуцированной модели позволяет выявить различия в динамике электронного транспорта, обусловленные особенностями структуры и регуляции ФСII в этих системах [Плюснина и др. 2012]. Вторая модель, более детализированная в части, касающейся КВК, редуцируется по принципу квазистационарности [Plyusnina et al. 2024]. Комбинация таких редуцированных моделей позволяет анализировать гетерогенность популяции реакционных центров и дает возможность одновременной оценки как размера светособирающей антенны, так и функционального состояния КВК, что особенно важно при анализе стрессовых воздействий.

Дополнением к кинетическому моделированию служит метод спектрального мультиэкспоненциального анализа (СМЭА) [Плюснина и др. 2015; Antal et al 2019; Plyusnina et al. 2020], позволяющий выявлять скрытые фазы индукции флуоресценции, недоступные при визуальной интерпретации кривой. Этот метод обеспечивает количественную оценку характерных времен и амплитуд отдельных компонентов динамики, что повышает чувствительность анализа и позволяет фиксировать ранние признаки стресса задолго до появления морфологических или ростовых изменений.

2.1. Модель переноса электронов в ФСII

2.1.1. Построение модели

Для построения модели на основе предположения о квазистационарности была рассмотрена последовательность процессов переноса электронов в реакционном центре ФСII (рис. 2.1a).

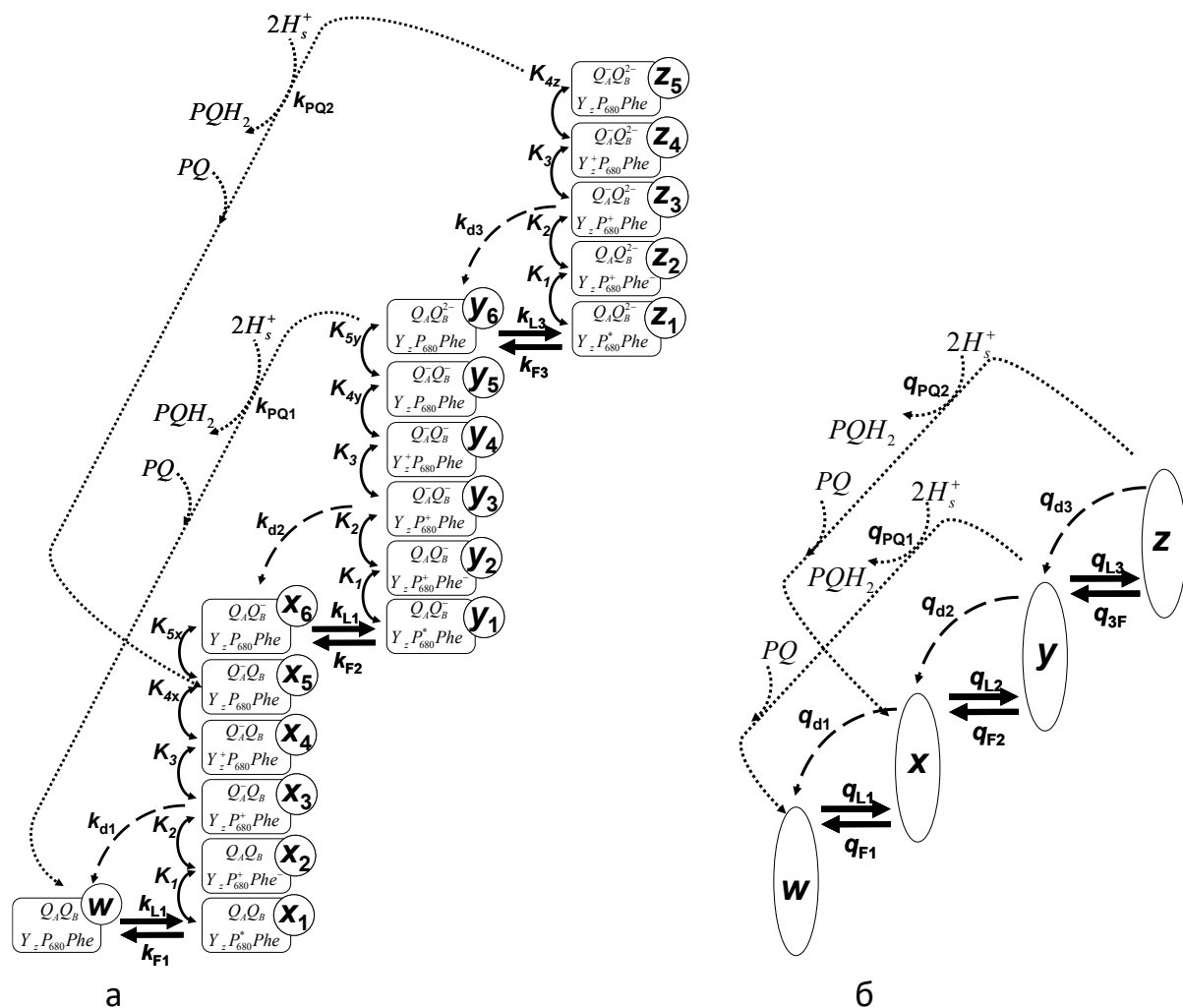


Рисунок 2.1 – Схемы первичных процессов переноса электронов в реакционном центре ФС II: а – детальная схема. Прямоугольники – состояния реакционного центра ФСII с различной степенью восстановленности входящих в него переносчиков. P_{680} - пигмент хлорофилла. Phe – феофетин, первичный акцептор электрона. Q_A и Q_B соответственно первичный и вторичный хиноны. Y_z тирозин, донор электрона для P_{680} . w – нейтральное состояние, x_i – состояния с одним электроном, y_i – состояния с двумя электронами, z_i – состояния с тремя электронами. Жирными стрелками показаны световые стадии, на которых перенос электрона зависит от интенсивности света. Тонкими сплошными стрелками показаны равновесные стадии переноса электронов. Тонкие пунктирные стрелки соответствуют безызлучательным переходам. Стрелки, состоящие из точек, описывают процессы обмена с Q_B -сайтом; б – редуцированная схема. w – нейтральное состояние, x – сумма состояний с одним электроном, y – сумма состояний с двумя электронами, z – сумма состояний с тремя электронами. q_{Li} – эффективные константы световых стадий, $i=1,2,3$; q_{Fi} – эффективные константы флуоресценции, $i=1,2,3$; q_{di} – эффективные константы безызлучательной рекомбинации зарядов, $i=1,2,3$; q_{PQi} – эффективные константы переноса электрона на пул пластохинонов, $i=1,2$.

В условиях темновой адаптации все реакционные центры находятся в открытом (нейтральном) состоянии w . Под действием света происходит возбуждение пигмента P_{680} , состояние w переходит в состояние x_1 , с константой скорости k_{L1} . Обратный переход с константой k_{F1} описывает флуоресценцию

состояния x_1 . Далее следует последовательность быстрых стадий переноса электрона $x_1 \dots x_6$, опосредуемых переносчиками – феофетином (*Phe*), первичным и вторичным хинонами Q_A и Q_B , в которых состояние x_1 через промежуточные состояния последовательно переходит в x_6 , состояние, в котором электрон достигает конечного акцептора ФСII хинона Q_B , восстанавливая его до Q_B^- . Следующий квант света, поглощаемый в реакции k_{L2} , вызывает аналогичную последовательность реакций $y_1 \dots y_6$ с той разницей, что в промежуточных состояниях y_{1-5} Q_B уже частично восстановлен (имеет один электрон, Q_B^-), а в состоянии y_6 Q_B восстановлен полностью (Q_B^{2-}). Третий квант света в реакции k_{L3} вновь вызывает аналогичные переходы состояний $z_1 \dots z_5$, в которых Q_B полностью восстановлен (состояние с двумя электронами, Q_B^{2-}), поэтому цепочка реакций заканчивается восстановлением Q_A до Q_A^- . z_5 – максимально восстановленное состояние хинонных акцепторов. Состояния y_6 и z_5 могут дважды протонироваться, после чего восстановленный пластохинон высвобождается в раствор из Q_B -сайта, а нейтральный пластохинон вновь садится на Q_B -сайт в реакциях k_{PQ1} и k_{PQ2} . При этом реакционные центры вновь становятся открытыми, способными переносить электрон, и цикл повторяется. С восстановленного пластохинона электроны передаются на цитохромный комплекс, пластоцианин и далее к реакционным центрам фотосистемы I.

Было сделано предположение, что «быстрые» процессы (перенос электронов между комплексами) находятся в квази-равновесии по отношению к «медленным» (световые реакции), поскольку скорость световых стадий, определяемая частотой поглощения квантов света, существенно меньше скорости переноса электронов между комплексами.

Последовательности реакций для x_i , y_i , z_i ($i=1 \dots 6$) отличаются числом электронов на вторичном хиноне Q_B : в состояниях x_i происходит перенос электрона при изначально нейтральном Q_B ; в состояниях y_i на вторичном хиноне изначально находится один электрон, Q_B^- ; в состояниях z_i на вторичном хиноне изначально находятся два электрона, Q_B^{2-} .

Наличие квази-равновесных состояний позволило редуцировать исходную систему, вводя новые переменные $x = \sum_{i=1}^6 x_i$, $y = \sum_{i=1}^6 y_i$, $z = \sum_{i=1}^5 z_i$ и совершая соответствующие преобразования [Плюснина и др.2012].

Система уравнений, соответствующая редуцированной схеме на рисунке 2.1б, с учетом закона сохранения ($w + x + y + z = w_0$) имеет вид:

$$\frac{dx}{dt} = -(q_{L1} + q_{F1} + q_{L2} + q_{d1})x + (-q_{L1} + q_{F1} + q_{d2})y + (-q_{L1} + q_{PQ2})z + q_{L1}w_0 \quad (2.1)$$

$$\frac{dy}{dt} = q_{L2}x - (q_{F2} + q_{L3} + q_{2d} + q_{PQ1})y + (q_{F3} + q_{d3})z \quad (2.2)$$

$$\frac{dz}{dt} = q_{L3}y - (q_{F3} + q_{d3} + q_{PQ2})z \quad (2.3)$$

где w_0 - суммарная концентрация всех реакционных центров, а константы скоростей в полученной редуцированной системе q_{Li} , q_{Fi} , q_{di} , q_{PQi} являются сочетаниями констант исходной детальной схемы реакций k_{Li} , k_{Fi} , k_{di} , k_{PQi} , K_i .

Флуоресценция вводилась как сумма всех флуоресцирующих состояний: $F = x_1 + y_1 + z_1$. В новых переменных редуцированной модели флуоресценция описывается как $F = \frac{x}{D_x} + \frac{y}{D_y} + \frac{z}{D_z}$, где D_x , D_y и D_z - сочетания констант элементарных стадий исходной модели.

2.1.2. Оценка параметров модели

Большинство констант детальной модели измерены экспериментально, их величины хорошо известны. Для реакций между состояниями, которые отличались только наличием электрона на Q_B , предполагалось, что константы равновесия соответствующих переходов равны между собой. Так константы равновесия переходов $x_1 \leftrightarrow x_2$, $y_1 \leftrightarrow y_2$, $z_1 \leftrightarrow z_2$ равны между собой и равны K_1 , константы равновесия переходов $x_2 \leftrightarrow x_3$, $y_2 \leftrightarrow y_3$, $z_2 \leftrightarrow z_3$ также равны между собой и равны K_2 и константы равновесия переходов $x_3 \leftrightarrow x_4$, $y_3 \leftrightarrow y_4$, $z_3 \leftrightarrow z_4$ равны между собой и равны K_3 . Согласно современным представлениям [Renger, Renger 2008] при последовательном попадании 4-х квантов света в систему реакционного центра происходит донирование электронов от воды в 4 стадии,

которые существенно отличаются друг от друга по времени, поэтому константы равновесия K_{4x} , K_{4y} , K_{4z} для стадий $x_4 \leftrightarrow x_5$, $y_4 \leftrightarrow y_5$, $z_4 \leftrightarrow z_5$, соответствующим реакциям переноса электронов от воды, отличаются друг от друга. В соответствии с литературными данными перенос электрона с Q_A на Q_B зависит от степени окисления хинона Q_B , поэтому константы равновесия K_{5x} и K_{5y} для стадий $x_5 \leftrightarrow x_6$, $y_5 \leftrightarrow y_6$, также отличаются по величине.

Оценка значений констант, используемых в исходной детальной модели приведена в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Значения констант, используемых в модели

Стадия	Обозначения параметров, используемые в детальной модели	Значения констант, приведенные в литературе		Ссылки
		<i>Константы скорости</i>	<i>Константы равновесия</i>	
Возбуждение пигментного комплекса	k_L	4-5.5 мс ⁻¹		Lazar 2003
		0.0002 мс ⁻¹		Belyaeva 2008
Флуоресценция	k_F	$6.7 \cdot 10^4$ мс ⁻¹		Rabinovich and Govindjee, 1969
Разделение зарядов (открытые РЦ)	K_1		100	Roelofs 1992
Разделение зарядов (закрытые РЦ)	K_2		10^8	Renger and Holzwarth, 2005
Восстановление Р680	K_3		200	Renger 2001
Восстановление тирозина Yz	K_{4x}		29	Brettel 1984
	K_{4y}		3	
	K_{4z}		3	
Перенос 1-го электрона на Q_B	K_{5x}		14	Crofts and Wraight, 1983
Перенос 2-го электрона на Q_B	K_{5y}		1	Crofts and Wraight, 1983
Обмен PQH ₂ с Q_B -сайтом	k_{PQ}	0.004-0.03 мс ⁻¹		Baake and Schloder, 1992
Безызлучательные переходы	k_d	3.8-10 мс ⁻¹		Steffen 2005

Анализируя величины констант, приведенные в таблице 2.1, можно заметить, что световая константа k_L имеет достаточно широкий диапазон значений. Это может объясняться тем, что величина световой константы зависит от интенсивности света и от размера антенны, у которой площадь эффективного сечения для различных объектов отличается. Величина константы k_{PQ} также может значительно варьировать, поскольку относится к эффективному процессу, включающему не только взаимодействие пластохинона с Q_B -сайтом, но и его диффузию в мембране. Константы безызлучательных переходов k_d в литературе оценены в основном из модельных расчетов [Steffen 2005], и их величины, по-видимому, могут зависеть от условий эксперимента.

Таким образом, большинство констант реакций для модельных расчетов были зафиксированы в соответствии с величинами, приведенными в таблице 1. В численном же счете при аппроксимации экспериментальных кривых определялись: световая константа k_L , константы безызлучательных переходов k_d и константы реакции обмена пластохинона с Q_B -сайтом k_{PQ} .

2.1.3. Результаты численных экспериментов

Численные эксперименты проводились с помощью программы DBSolve Optimum [Gizzatkulov et al., 2010], которая позволяет получать решения систем дифференциальных уравнений, а также проводить аппроксимацию модельных решений по экспериментальным точкам. Для верификации модели были использованы кривые индукции флуоресценции, полученные при действии света интенсивностью $I=1000, 2000, 4000$ мкЭ м⁻²с⁻¹ на листья фасоли и клетки водоросли *Chlorella* [Плюснина и др. 2015]. Экспериментальные точки были нормированы на (F_m-F_0) с тем, чтобы область изменений всех кривых лежала от 0 до 1. Переменные модели были нормированы на суммарную концентрацию всех реакционных центров w_0 , а функция, описывающая флуоресценцию – на свое максимальное значение. Таким образом, при нулевом начальном условии модельные кривые также изменялись от 0 до 1. Значения эффективных констант модели q_{Li} , q_{di} , q_{PQi} определялись путем аппроксимации экспериментальных

данных с помощью численного решения модели. Результаты аппроксимации представлены на рисунке 2.2.

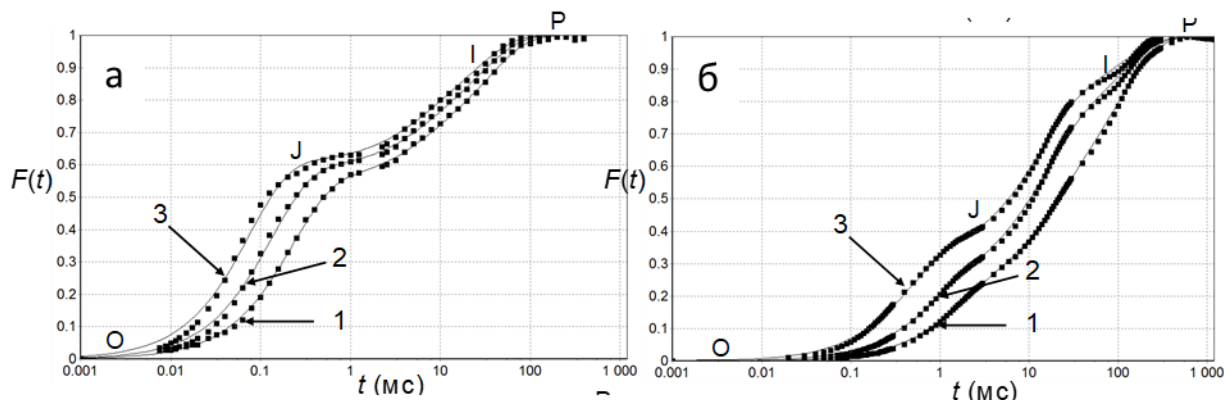


Рисунок 2.2 – Кривые индукции флуоресценции, полученные с помощью редуцированной модели: а – для клеток водорослей, б – для листьев фасоли. Точки – экспериментальные данные. Непрерывные линии – модельные кривые. Кривые 1, 2, 3 соответствуют интенсивностям света $I = 1000, 2000, 4000 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$ соответственно. Параметры модели, при которых наблюдается наилучшее совпадение модельных и экспериментальных кривых, приведены в таблице 2.2.

Используя полученные при аппроксимации эффективные константы, а также соотношения, связывающие эффективные константы с константами элементарных стадий исходной детальной модели [Плюснина и др. 2012], были получены значения параметров исходной модели (табл. 2).

Таблица 2.2 – Значения элементарных констант исходной детальной модели

Клетки водоросли			Листья фасоли		
I=1000	I=2000	I=4000	I=1000	I=2000	I=4000
$k_{L1} = 1.074$	$k_{L1} = 1.953$	$k_{L1} = 3.525$	$k_{L1} = 0.142$	$k_{L1} = 0.287$	$k_{L1} = 0.677$
$k_{L2} = 0.243$	$k_{L2} = 0.252$	$k_{L2} = 0.287$	$k_{L2} = 0.121$	$k_{L2} = 0.196$	$k_{L2} = 0.183$
$k_{L3} = 0.206$	$k_{L3} = 0.227$	$k_{L3} = 0.243$	$k_{L3} = 0.053$	$k_{L3} = 0.035$	$k_{L3} = 0.032$
$k_{1d} = 3.12 \cdot 10^4$	$k_{1d} = 5.33 \cdot 10^4$	$k_{1d} = 9.35 \cdot 10^4$	$k_{1d} = 0.91 \cdot 10^4$	$k_{1d} = 1.67 \cdot 10^4$	$k_{1d} = 3.01 \cdot 10^4$
$k_{2d} = 695.61$	$k_{2d} = 583.49$	$k_{2d} = 628.41$	$k_{2d} = 553.22$	$k_{2d} = 597.68$	$k_{2d} = 535.60$
$k_{3d} = 0.049$	$k_{3d} = 0.119$	$k_{3d} = 0.122$	$k_{3d} = 0.015$	$k_{3d} = 0.01$	$k_{3d} = 0.0096$
$k_{ex1} = 6.7 \cdot 10^{-2}$	$k_{ex1} = 5.8 \cdot 10^{-2}$	$k_{ex1} = 6.4 \cdot 10^{-2}$	$k_{ex1} = 1.3 \cdot 10^{-3}$	$k_{ex1} = 1.7 \cdot 10^{-3}$	$k_{ex1} = 1.9 \cdot 10^{-3}$
$k_{ex2} = 1.1 \cdot 10^{-4}$	$k_{ex2} = 1.3 \cdot 10^{-4}$	$k_{ex2} = 7.2 \cdot 10^{-4}$	$k_{ex2} = 1.0 \cdot 10^{-4}$	$k_{ex2} = 1.5 \cdot 10^{-4}$	$k_{ex2} = 1.8 \cdot 10^{-4}$
$K_{4x} = 3, K_{4y} = 50, K_{4z} = 110$			$K_{4x} = 6, K_{4y} = 50, K_{4z} = 110$		

Как указывалось выше, благодаря однозначному соответствию между переменными и параметрами полной и упрощенной моделей, полученные значения параметров упрощенной модели можно использовать для описания динамики переменных исходной детальной модели. На рисунке 2.3 представлена динамика состояний исходной детальной модели с разной степенью восстановления хинонных акцепторов.

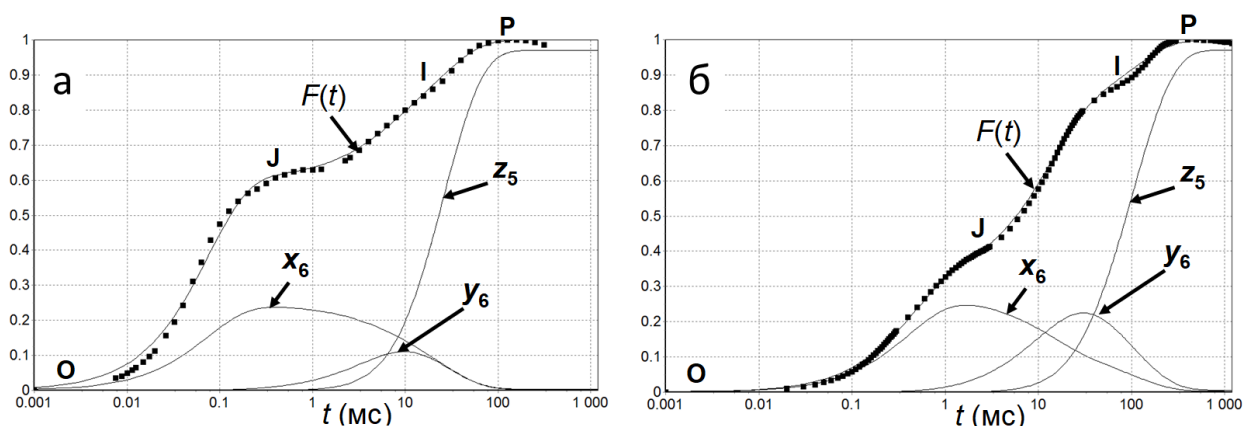


Рисунок 2.3 – Динамика переменных исходной детальной модели: а – для клеток водорослей; б – для листьев фасоли; точки – экспериментальные данные для интенсивности света $I=4000 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$; x_6 , y_6 и z_5 – состояния с одним, двумя и тремя электронами на хинонных акцепторах.

Из приведенных на рисунках 2.2 и 2.3 решений видно, что упрощенная модель дает хорошее совпадение модельных решений с экспериментальными кривыми индукции флуоресценции для разных интенсивностей света и для разных (высших и низших) растительных организмов. При этом можно получить соответствующую динамику переменных исходной детальной модели (рис. 2.3), используя их выражения через переменные упрощенной модели.

Таким образом, на основе проведенного анализа продемонстрирована эффективность иерархического подхода к редукции детальной кинетической модели ФСII, основанного на принципе квазиравновесия. Исходная модель, описывающая 18 различных состояний ФСII и переходы между ними, была существенно упрощена до трех дифференциальных уравнений, описывающих суммарную динамику состояний, различающихся по степени восстановленности. Аналитическое решение этой системы представляет собой сумму трех экспоненциальных функций, что дает возможность описывать экспериментальные кривые индукции флуоресценции с помощью редуцированной модели с той же степенью точности, что и при непосредственном разложении кривых на три экспоненты, часто применяемом при обычном анализе таких кривых, однако, в аналитическом решении модели параметры экспоненциальных функций являются не абстрактными величинами, а сочетаниями констант детальной модели. Благодаря однозначному

соответствию между переменными редуцированной и исходной моделей, можно вычислить временные зависимости состояний с одним (x_6), двумя (y_6) и тремя (z_5) электронами на хинонных акцепторах. Анализ этих кривых показывает, что фаза OJ в основном определяется накоплением одноэлектронных состояний, фаза II – двухэлектронных, а достижение максимального уровня флуоресценции F_m коррелирует с максимумом трехэлектронных форм, что свидетельствует о практически полном восстановлении реакционных центров при насыщающем освещении. При этом выявлены видоспецифические особенности: у *Chlorella* световые константы k_{Li} в 7 раз выше, чем у фасоли, что может объясняться различиями в размерах антенны, однако необходимо учитывать, что частично погрешность могут вносить оптические эффекты – суспензии водорослей обладают большей прозрачностью по сравнению с плотной тканью листа, что влияет на распределение светового потока и, соответственно, на кинетику индукции. Полученные результаты качественно согласуются с данными, рассчитанными в известных детальном моделях [Lazar, 2003; Strasser, Stirbet, 2001], для сопоставимых состояний ФСЦ. Однако ключевое преимущество предложенной редуцированной модели заключается в ее вычислительной простоте и практической применимости. В отличие от громоздких моделей с большим числом уравнений, редуцированная модель позволяет эффективно описывать экспериментальные кривые индукции флуоресценции, восстанавливая сначала кинетику суммарных состояний, а затем с помощью установленных аналитических соотношений «разворачивать» эти данные для получения динамики отдельных микросостояний исходной детальной модели.

Таким образом, разработанная редуцированная модель объединяет вычислительную эффективность простых схем с возможностью описания переходов в детальных моделях ФСЦ. Такая модель позволяет быстро обрабатывать массивы экспериментальных данных и получать количественные оценки элементарных кинетических констант.

На основе предложенного подхода, где элементарные константы сохраняются в явном виде и могут быть оценены по эффективным параметрам,

была построена следующая, модель с более детальным описанием процессов на донорной стороне ФСII, связанных с кислород-выделяющим комплексом (КВК). Поскольку первая модель, построенная с учетом иерархии временных масштабов и принципа квазиравновесия, в конечном счете свелась к простой аналитически разрешимой системе, ожидалось аналогичное упрощение и во второй модели, несмотря на ее большую детализацию, что и было получено и описано в следующем разделе. Простые формы редуцированных моделей позволяют использовать их комбинацию для описания разных типов реакционных центров для анализа гетерогенности ФСII, проявляющейся при изменении внешних условий, в том числе при стрессовых воздействиях.

2.2. Иерархическая модель ФСII под действием DCMU для анализа гетерогенности антенны и кислород-выделяющего комплекса

Реакционные центры ФСII гетерогенны по своей природе (рис. 2.4.). Гетерогенность может проявляться в строении и размере светособирающей антенны. Донорная часть ФСII, связанная с КВК, также может проявлять гетерогенность вследствие различной активности КВК. Еще одним вариантом гетерогенности ФСII являются Q_B -невосстанавливающие центры, в которых частично или полностью заблокирован перенос электрона с первичного хинона на вторичный.

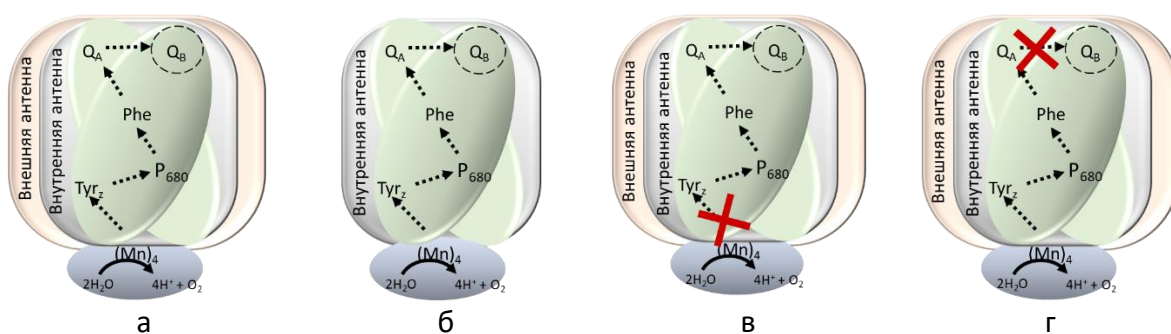


Рисунок 2.4 – Популяция ФСII как смесь различных форм: а – норма, реакционные центры с полной антенной, активным КВК и незаблокированным переносом электрона на Q_B , α -центры; б – реакционные центры без внешней антенны, β -центры; в – реакционные центры с неактивным КВК; г – Q_B -невосстанавливающие центры.

Так, в работе [Terentyev et al. 2020] для культуры водоросли *Chlamydomonas* было показано, что 12–16% РЦ в мембранах, обогащенных ФСII, не имеют

марганцевых кластеров, входящих в состав кислород-выделяющих комплексов. Было высказано предположение, что это связано с тем, что часть реакционных центров ФСII в препаратах находятся в процессе сборки или деградации [Terentyev et al. 2019, 2020]].

Гетерогенность антенны ФСII была впервые описана в работах Мелиса и Хоманна [Melis, Homann, 1975, 1976]. Анализируя кинетику подъема кривой индукции флуоресценции адаптированных к темноте хлоропластов в присутствии ингибитора DCMU, авторы выдвинули предположение о существовании двух популяций ФСII. Известно, что комплементарная площадь над кривой индукции флуоресценции (площадь между кривой флуоресценции и горизонтальной линией на максимальном уровне флуоресценции F_m) в присутствии DCMU пропорциональна количеству фотосистем, способных осуществлять восстановление первичного хинона Q_A [Malkin, Kok 1966, Murata et al. 1966]. Мелис и Хоманн [Melis, Homann 1975, 1976], рассматривая в полулогарифмическом масштабе кинетику индукции флуоресценции в присутствии DCMU, обнаружили две фазы с различными характерными временами и соотнесли их с двумя популяциями ФСII, а именно, альфа-центры - ФСII α и бета-центры - ФСII β . В дальнейшем была обнаружена и третья, еще более медленная, фаза, которую соотнесли с популяцией гамма-центров - ФСII γ [Hsu et al 1989; Hsu, Lee 1991].

Работы, в которых были получены трехмерные структуры ассоциированных с ФСII светособирающих комплексов, появились сравнительно недавно [Umena et al. 2011; Van Bezouwen et al. 2017]. Более ранние предположения о строении реакционных центров ФСII α , ФСII β и ФСII γ основывались на исследовании кинетики индукции флуоресценции. Считалось, что реакционные центры ФСII γ имеют только «коровую» антенну (~ 50 молекул хлорофилла a), реакционные центры ФСII β в дополнение к коровой антенне имеют также внутреннюю антенну (суммарно ~130 молекул хлорофилла a и b), а в реакционных центрах ФСII α имеется также периферическая антенна (суммарно ~210-250 молекул хлорофилла a и b) [Hsu, Lee 1995; Mathur et al. 2011]. Доминирующая форма,

ФСII α , локализована в гранах [Anderson, Melis 1983] и характеризуются наибольшей светособирающей антенной. Предполагается, что несколько реакционных центров ФСII α связаны общей антенной и способны передавать энергию возбуждения друг другу, что приводит к появлению сигмоидального участка на кривой индукции флуоресценции в присутствии DCMU [Joliot, Joliot 1964]. Однако, в работах [Sipka et al. 2021] экспериментально было показано, что сигмоидный участок может появиться и в условиях отсутствия связности (когда в реакционные центры содержат только коровую антенну), и его появление может быть связано, как предполагают авторы процитированной работы, с конформационными изменениями в реакционном центре. ФСII β располагаются в основном в стромальной области и характеризуются $\sim$ в 2 раза меньшим размером светособирающей антенны по сравнению с ФСII α , а также невозможностью передачи возбуждения между реакционными центрами, что приводит к экспоненциальной кинетике кривой индукции флуоресценции в присутствии DCMU. Процессы разделения зарядов и излучения флуоресценции в α - и β -центрах предполагаются сходными [Melis 1991].

Сообщалось, что стресс, вызываемый действием окружающей среды, может влиять на гетерогенность ФСII, увеличивая долю реакционных центров ФСII β [Pan et al. 2008; Singh-Tomar 2012; Dao, Beardall 2016; Markou et al. 2017]. Как было показано [Antal et al. 2010], размер антенны может меняться и в процессе адаптации к стрессу. Таким образом, анализ неоднородности реакционных центров по размеру светособирающей антенны может быть использован для определения структурных и/или функциональных изменений в условиях стресса, которые могут оказать негативное влияние на продуктивность ФСII и рост биомассы.

Для оценки размера антенны ФСII применяются различные методы, основанные на регистрации индуцированных светом изменений поглощения ее компонентов [McCauley, Melis 1986], регистрации скорости фиксации CO₂ [Malkin et al. 1981], стационарной скорости выделения кислорода [Henrysson, Sundby 1990], мгновенного выхода кислорода [Wang et al. 1973] или мгновенного

высвобождения протонов [Nedbal et al. 1991]. Однако применение таких методов возможно лишь в условиях *in vitro*, и позволяет получить лишь достаточно грубые усредненные оценки размера антенны.

Другой подход основан на анализе формы кривой индукции флуоресценции хлорофилла *a* в присутствии DCMU математическими методами [Lazar et al. 2001] и позволяет выявить существование нескольких пулов реакционных центров ФСII с различным размером антенны т.е. охарактеризовать ее гетерогенность. Получение индукционных кривых в присутствии DCMU не вызывает трудностей и позволяет получать обширные наборы таких кривых, например, на разных стадиях адаптации растительных организмов к стрессу. Это дает возможность оценить динамику изменения гетерогенности антенны ФСII в процессе развития стресса.

Одним из наиболее широко используемых математических методов выявления различных типов реакционных центров (ФСII α , ФСII β и ФСII γ) является выделение нескольких экспоненциальных фаз с различными характерными временами на площади между кривой индукции флуоресценции, отложенной в полулогарифмическом масштабе, и горизонтальной линией на максимальном уровне флуоресценции F_m (комплементарной площади). Наличие нескольких экспоненциальных фаз, как правило, соотносят с существованием нескольких популяций реакционных центров с разным размером светособирающей антенны: ФСII α , ФСII β и ФСII γ . Однако, как указывалось в работах [Lazar et al. 2001, Kalaji et al. 2016], точность метода разложения на экспоненты очень сильно зависит от точности определения максимума индукционной кривой значения F_m . Ошибка на 2-3% в определении F_m , может привести к ошибке на 100% в определении характерных времен и амплитуд фаз на кривой. В связи с этим было предложено [Lazar et al. 2001] использовать для анализа индукционных кривых математическую модель ФСII. В этом случае нет необходимости использовать комплементарные площади, а оценка гетерогенности производится непосредственно с помощью модели, путем идентификации ее параметров по экспериментальным данным. Для анализа

гетерогенности реакционных центров в образцах *Chlamydomonas*, обработанных DCMU, в работах [Lazar et al. 2001, de Marchin et al. 2014] была использована простая модель, рассматривающая два состояния ФСII: «открытые» и «закрытые» реакционные центры. Комбинация из нескольких таких моделей позволила авторам оценить долю различных реакционных центров (ФСII α , ФСII β и ФСII γ). Однако необходимо отметить, что фазы, обнаруживаемые на индукционной кривой в присутствии DCMU, могут отражать как наличие реакционных центров ФСII с антеннами различного размера, так и процессы с различными характерными временами, происходящие в одном реакционном центре, на что было указано в работах [Melis, Homann 1975, 1976]. Использование модели, включающей только два состояния [Lazar et al. 2001, de Marchin et al. 2014], не может ответить на вопрос, с чем соотносится дополнительная экспоненциальная фаза на кривой комплементарной площади: с другим типом антенны или с каким-либо процессом, поскольку единственная реакция в такой модели характеризует лишь световую стадию переноса электрона. Нужно подчеркнуть, что представленная в данном разделе модель детально описывает как световые стадии, так и реакции, связанные с КВК, что отличает ее от существующих моделей ФСII.

2.2.1. Построение модели и анализ ее решений

Детальная схема переходов между состояниями пигмент-белкового комплекса ФСII при действии на него ингибитора DCMU, блокирующего перенос электрона на вторичный хинон представлена на рисунке 2.5.

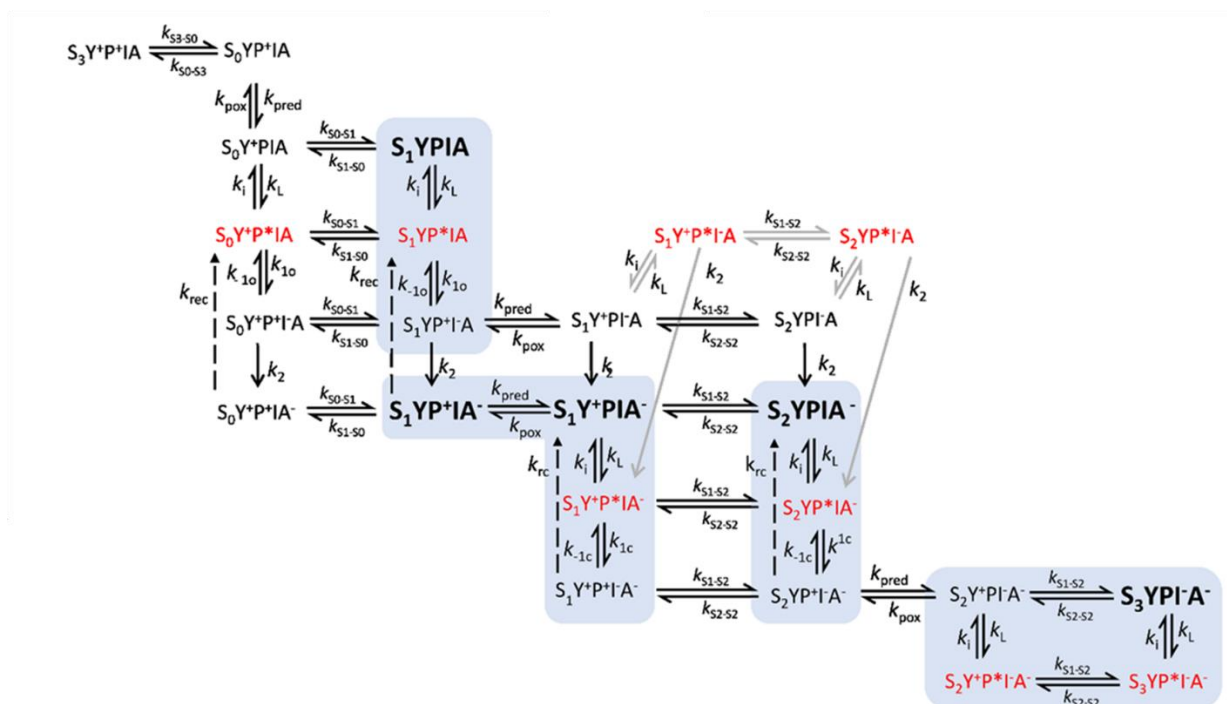


Рисунок 2.5 – Схема переходов между состояниями ФСII с учетом действия DCMU, блокирующего перенос с Q_A на Q_B ; красным цветом выделены возбужденные состояния; S_n ($n = 0, 1, 2, 3$) – кислород-выделяющий комплекс (КВК); Y – тирозин; P – пигмент реакционного центра P680; I – феофитин; A – первичный хинон Q_A ; k_i – константы скоростей элементарных реакций.

Диапазон характерных времен переходов между состояниями ФСII составляет 9 порядков – от пикосекунд до сотен миллисекунд. Наличие такой иерархии времен позволяет провести редукцию модели, используя теорему Тихонова [Тихонов, 1948]: если в системе дифференциальных уравнений можно выделить малый параметр ε при старших производных (так называемая система с сингулярным возмущением), тогда уравнения, содержащие ε , можно заменить на алгебраические, при этом решение редуцированной системы будет совпадать с решением исходной везде, за исключением начального интервала порядка ε . Все переменные системы были разделены на так называемые «быстрые» переменные – уравнения, которые содержат малый параметр при производной, и «медленные» – оставшиеся переменные, после чего уравнения для «быстрых» переменных были заменены на алгебраические. Исходная модель, состоящая из 24 обыкновенных дифференциальных линейных уравнений, общий вид которых

$\frac{dx_i}{dt} = \sum_j k_{ij}x_j$, была, таким образом, редуцирована в систему из 3-х обыкновенных дифференциальных линейных уравнений [Plyusnina et al. 2024]:

$$\frac{dx}{dt} = -k_x \cdot x, \quad (2.4)$$

$$\frac{dy}{dt} = k_x \cdot x - k_y \cdot y, \quad (2.5)$$

$$\frac{dz}{dt} = k_y \cdot y, \quad (2.6)$$

где, k_x включает световую константу и константы разделения и рекомбинации зарядов в открытых центрах: $k_x = \frac{k_L \cdot K_{oi}}{K_{oi}+1}$, $K_{oi} = \frac{k_2}{k_i} \cdot \frac{k_{1o}}{k_2+k_{-1o}}$. k_y включает константу переноса электрона от КВК на тирозин и константы восстановления и окисления P_{680} : $k_y = \frac{K_{pred}}{K_{pred}+1} \cdot k_{s1}$, $K_{pred}, K_{pred} = \frac{k_{pred}}{k_{pox}}$.

Выражение для интенсивности флуоресценции $F(t)$, включающее «быстрые» переменные, было записано через «медленные» переменные, благодаря однозначной связи между «быстрыми» и «медленными» переменными:

$$F(t) = \frac{k_L}{k_i} \left(\frac{x}{K_{oi}+1} + \frac{K_{pred}}{K_{pred}+1} \cdot \frac{y}{K_{ci}+1} + \frac{z}{K_{ci}+1} \right). \quad (2.7)$$

Здесь: $K_{oi} = \frac{k_2}{k_i} \cdot \frac{k_{1o}}{k_2+k_{-1o}}$ – комбинация констант скоростей реакций, связанных с разделением заряда в открытых реакционных центрах и переноса электрона на первичный хинон Q_A ; $K_{ci} = \frac{k_{rc}}{k_i} \cdot \frac{k_{1c}}{k_{rc}+k_{-1c}}$ – комбинация констант скоростей реакций, связанных с разделением заряда в закрытых реакционных центрах (с электроном на Q_A) и рекомбинацией зарядов между P_{680}^+ и феофитином I^- ;

$K_{pred} = \frac{k_{pred}}{k_{pox}}$ – константа равновесия в реакции переноса электрона от тирозина на P_{680} .

Для полученной системы с учетом закона сохранения $x + y + z = 1$ было найдено аналитическое решение:

$$x = \exp(-k_x \cdot t), \quad (2.8)$$

$$y = 1 - x - z, \quad (2.9)$$

$$z = \frac{k_y}{k_y - k_x} \cdot \exp(-k_x \cdot t) + \frac{k_x}{k_y - k_x} \cdot \exp(-k_y \cdot t) \cdot + 1. \quad (2.10)$$

В результате выражение для интенсивности флуоресценции $F(t)$ было представляет собой сумму двух экспоненциальных функций:

$$F(t) = A_1 \cdot (1 - \exp(-k_x \cdot t)) + A_2 \cdot (1 - \exp(-k_y \cdot t)), \quad (2.11)$$

где

$$A_1 = -\frac{F_{ot}}{1-F_{ot}} + \frac{k_y - k_x \cdot Kpred / (1 + Kpred)}{(k_y - k_x) \cdot (1 - F_{ot})}, A_2 = -\frac{k_x(1 - Kpred / (1 + Kpred))}{(k_y - k_x) \cdot (1 - F_{ot})}. \quad (2.12)$$

$F_{ot} = \frac{K_{oi}}{K_{ci}}$ соответствует отношению минимального уровня флуоресценции к максимальному, является сочетанием констант разделения зарядов в открытых и закрытых центрах, а также константы рекомбинации.

Численные решения для $F(t)$ в полной и редуцированной моделях отличаются только в пикосекундном диапазоне, а начиная с наносекундного – практически совпадают (рис. 2.6).

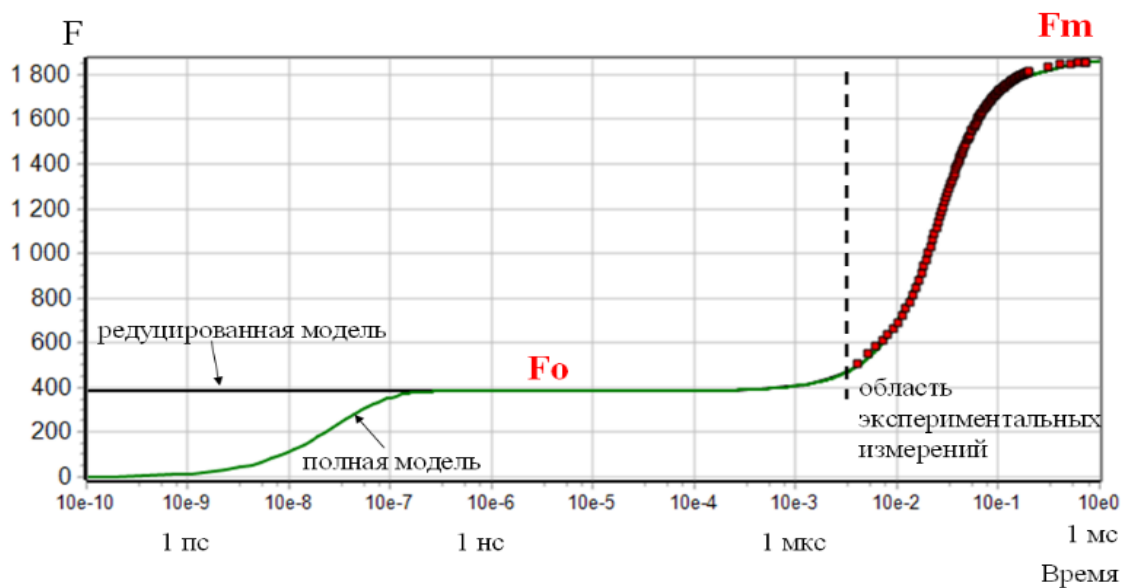


Рисунок 2.6 – Кривая индукции флуоресценции, полученная для полной модели (зеленая кривая) и для редуцированной (черная кривая); красными точками обозначены типичная кривая, полученная в эксперименте.

Таким образом, решение модели представляет собой двухфазную кривую, каждой фазе соответствует экспоненциальная функция со своим характерным временем, нарастание или спад фаз определяется знаками предэкспоненциальных множителей A_1 и A_2 , зависящими от конкретного сочетания входящих в них параметров. Знак и значение предэкспоненциальных множителей A_1 и A_2 сложным образом зависят от соотношения всех параметров модели и могут изменяться в зависимости от соотношения характерных времен

$1/k_x$ и $1/k_y$. При регистрации индукционных кривых в экспериментах интенсивность актиничного света может варьироваться в широком диапазоне, в модели это соответствует изменению значения параметра k_x . Была исследована зависимость A_1 и A_2 от константы скорости светозависимой реакции k_x , при значениях параметров, взятых из работы Лазара [Lazar 2003] (рис. 2.7).

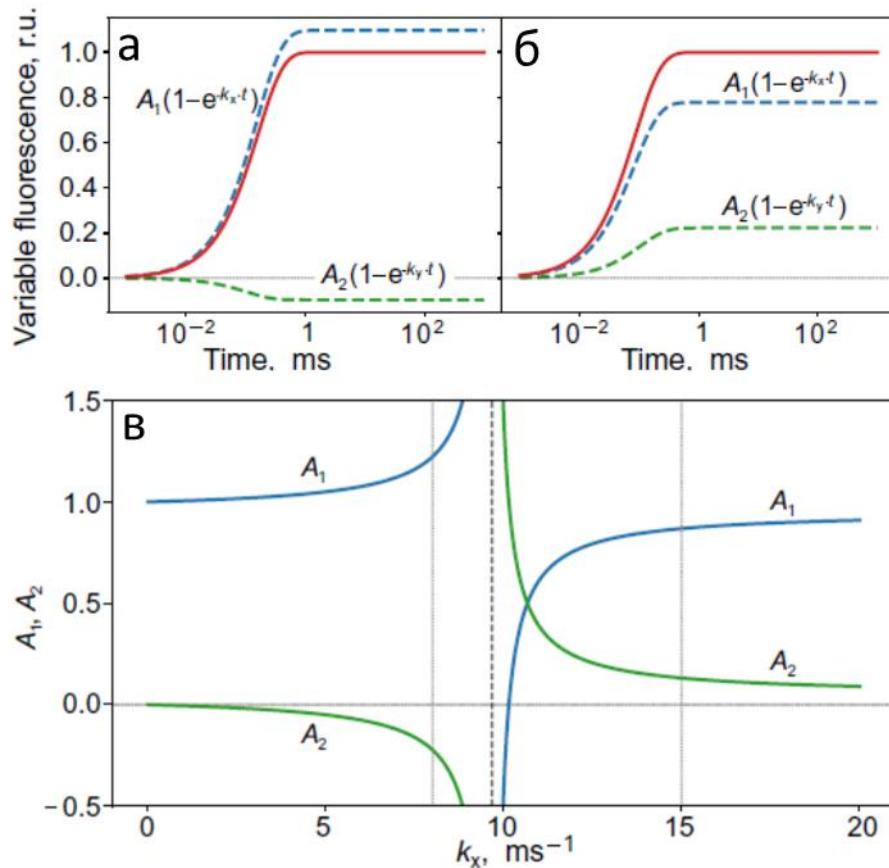


Рисунок 2.7 – Вклад экспоненциальных функций (зеленая и синяя штриховые кривые) в общее решение модели (красная кривая): а – при $k_x = 8 \text{ ms}^{-1}$; б – при $k_x = 15 \text{ ms}^{-1}$; в – зависимость амплитуд редуцированного модельного решения (2.12) от значения k_x . $A_1(k_x)$ – синяя кривая, $A_2(k_x)$ – зеленая кривая; вертикальные пунктирные линии соответствуют $k_x = 8 \text{ ms}^{-1}$ и $k_x = 15 \text{ ms}^{-1}$; вертикальная штриховая линия соответствует $k_x = 10 \text{ ms}^{-1}$.

При относительно малых интенсивностях света (рис. 2.7а, $k_x < 10 \text{ ms}^{-1}$) $A_1 > 0$, и экспоненциальный член с A_1 отражает динамику разделения зарядов, при этом $A_2 < 0$ (рис. 2.7в, $k_x < 10 \text{ ms}^{-1}$), и экспоненциальный член с A_2 отражает переход S_1 - S_2 в КВК и вносит вклад в форму начального участка индукционной кривой, обуславливая его сигмоидность. При высокой интенсивности света (рис. 2.7б, $k_x > 10 \text{ ms}^{-1}$) амплитуда A_2 становится положительной (рис. 2.7в, $k_x > 10 \text{ ms}^{-1}$). Следует отметить, что, если бы для обнаружения неоднородности

реакционных центров ФСII в таком случае применялся метод комплементарной площади, как, например, в работе [Mathur et al. 2011] эта дополнительная фаза могла бы быть неверно истолкована как существование реакционных центров ФСII с разными размерами светособирающих антенн.

Таким образом, с помощью редуцированной модели установлено, что вторая фаза индукционной кривой, измеренной в присутствии DCMU, может отражать как реакционные центры с уменьшенной антенной, так и реакционные центры с неактивным кислород-выделяющим комплексом (КВК). Распространенная в литературе интерпретация этой фазы исключительно для оценки гетерогенности реакционных центров по размеру антенны не является универсальной. Для корректной интерпретации дополнительных фаз индукционной кривой, выявленных экспоненциальным разложением, необходимо их сопоставление с моделью, учитывающей совокупность возможных физиологических состояний ФСII.

2.2.2. Модель как инструмент оценки гетерогенности реакционных центров

Простой вид полученной модели позволил составить различные комбинации для моделирования гетерогенности реакционных центров ФСII, различающихся размером антенны и активностью кислород-выделяющего комплекса донорной стороны. Флуоресценцию с учетом разных долей альфа- и бета-центров можно записать как

$$F_{\alpha\beta} = \alpha \cdot F_{\alpha} + (1 - \alpha) \cdot F_{\beta}, \quad (2.13)$$

где F_{α} и F_{β} – флуоресценция, соответственно, альфа- и бета-центров, α - и β - доли альфа- и бета-центров. Каждый тип реакционного центра ФСII может содержать как активный, так и неактивный КВК, что может быть отражено как

$$F_{\alpha} = s \cdot F_{\alpha}^{s+} + (1 - s) \cdot F_{\alpha}^{s-}, F_{\beta} = s \cdot F_{\beta}^{s+} + (1 - s) \cdot F_{\beta}^{s-}, \quad (2.14)$$

где F_i^{s+} – флуоресценция i -го центра с активным КВК, F_i^{s-} – флуоресценция i -го центра с неактивным КВК, s – доля активных КВК.

Таким образом, была получена комбинация из 4-х моделей, в целом отражающая гетерогенность и в размере антенны, и в активности КВК. Далее

были оценены комбинированные параметры для реакционных центров ФСПа и ФСβ, которые включают упомянутые выше элементарные константы, используя их значения из таблицы 3 в статье [Roelofs et al. 1992]. Комбинированный параметр $F_{ot} = \frac{(k_2+k_{-1o})(k_{rc} \cdot k_{1c} + k_i \cdot k_{rc} + k_i \cdot k_{-1c})}{(k_{rc} + k_{-1c})(k_2 \cdot k_{1o} + k_i \cdot k_2 + k_i \cdot k_{-1o})}$ обозначает отношение интенсивностей флуоресценции в открытых и закрытых реакционных центрах. Его значение составляет 0,220 и 0,213 для реакционных центров ФСПа и ФСПβ соответственно. Комбинированный параметр k_x содержит выражение $\frac{K_{oi}}{K_{oi}+1}$, описывающее эффективность разделения зарядов, и множитель k_L , отражающий изменение способности реакционного центра к поглощению света. Отношение $\frac{K_{oi}}{K_{oi}+1}$ составляет 0,9 и 0,86 для реакционных центров ФСПа и ФСПβ соответственно. Следовательно, различия в значениях параметров k_x ($k_{x\alpha}$, $k_{x\beta}$) в основном обусловлены изменениями способности реакционных центров к поглощению света. Оценка показала, что, несмотря на большую разницу в значениях элементарных констант скорости, значения их комбинаций оказываются очень близкими. Исходя из вышеизложенных рассуждений, в дальнейшем моделировании значение F_{ot} считалось общим, а $k_{x\alpha}$ и $k_{x\beta}$ - различными для реакционных центров ФСПа и ФСПβ. В реакционных центрах с неактивным КВК перенос электронов от КВК отсутствует ($k_{S1-S2} = 0$), в то время как остальные параметры в этих четырех типах реакционных центров имеют одинаковые значения. При этом предположении аналитическое решение для комбинированной модели было записано как сумма трех экспоненциальных функций с характерными временами $1/k_{x\alpha}$, $1/k_{x\beta}$, $1/k_y$:

$$F_{\alpha\beta}(t) = A_1 \cdot e^{-k_{x\alpha} \cdot t} + A_2 \cdot e^{-k_{x\beta} \cdot t} + A_3 \cdot e^{-k_y \cdot t} + 1, \quad (2.15)$$

где

$$A_1 = \frac{\alpha \cdot (F_{ot} - K - \frac{k_y(1-K)}{k_y - k_{x\alpha}} \cdot s) \cdot F_{m\alpha}}{(s + K \cdot (1-s)) \cdot (\alpha \cdot F_{m\alpha} + \beta \cdot F_{m\beta})}, A_2 = \frac{\beta \cdot (F_{ot} - K - \frac{k_y(1-K)}{k_y - k_{x\beta}} \cdot s) \cdot F_{m\beta}}{(s + K \cdot (1-s)) \cdot (\alpha \cdot F_{m\alpha} + \beta \cdot F_{m\beta})}, A_3 = \frac{(1-K) \cdot s \cdot (\frac{\alpha \cdot F_{m\alpha} \cdot k_{x\alpha}}{k_y - k_{x\alpha}} + \frac{\beta \cdot F_{m\beta} \cdot k_{x\beta}}{k_y - k_{x\beta}})}{(s + K \cdot (1-s)) \cdot (\alpha \cdot F_{m\alpha} + \beta \cdot F_{m\beta})}.$$

Для верификации комбинированной модели (2.15) были использованы кривые индукции флуоресценции, полученные в присутствии DCMU: 1) для

культуры клеток *Chlamydomonas reinhardtii* при различном освещении (изменяется эффективный размер антенны); 2) для культуры клеток *Scenedesmus obliquus* после кратковременного нагрева с последующим охлаждением (изменяется активность КВК). Чтобы уменьшить число степеней свободы и получить однозначный набор параметров для каждого случая анализа использовался набор кривых, которые анализировались одновременно. Данные каждого эксперимента нормировались относительно максимального значения (F_m) кривой, полученной при минимальной интенсивности света. Аппроксимация экспериментальных данных и построение соответствующих графиков выполнялись с помощью программного пакета DBSolve [Gizzatkulov et al. 2010]. Стандартные погрешности оценки параметров уточнялись путем повторного подбора результатов с использованием библиотеки Imfit для языка программирования Python [Newville et al. 2023]. Графическое представление моделей было выполнено с помощью библиотеки Matplotlib для Python [Hunter, 2007].

2.2.2.1 Влияние различной интенсивности актиничного света на гетерогенность реакционных центров в клетках *Chlamydomonas reinhardtii*

Был проанализирован набор индукционных кривых, полученных для суспензии клеток *C. reinhardtii* при восьми интенсивностях актиничного света от 940 до 6230 мкЭ м⁻² с⁻¹. Для учета различий в интенсивности света при аппроксимации экспериментальных кривых по были оценены параметры k_{α} и k_{β} для минимальной интенсивности действующего света (940 мкЭ м⁻² с⁻¹), а также коэффициенты u_i для каждой из кривых, полученных при других интенсивностях света, следующим образом: $k_{\alpha i} = k_{\alpha} \cdot u_i$ и $k_{\beta i} = k_{\beta} \cdot u_i$. Полученные множители практически совпали с отношением интенсивности актиничного света к минимальной интенсивности для каждой кривой (табл. 2.3). При построении модельных кривых (рис. 2.8 а) значения интенсивности флуоресценции были умножены на значение F_m для экспериментальной кривой, полученной при минимальной интенсивности актиничного света (рис. 2.8 а, кривая 1). Модель хорошо описывает экспериментальные данные в широком диапазоне

интенсивностей света (рис. 2.8а). Реакционные центры ФСIIa составляли 55% всех реакционных центров ФСII, а 43% реакционных центров обладали активным КВК. При найденных значениях параметров (табл. 2.3) вклад восстановления P_{680+} от КВК в наблюдаемую кинетику флуоресценции при всех изученных интенсивностях света оказался незначительным (амплитуда A_3 , табл. 2.3 и рис. 2.8б).

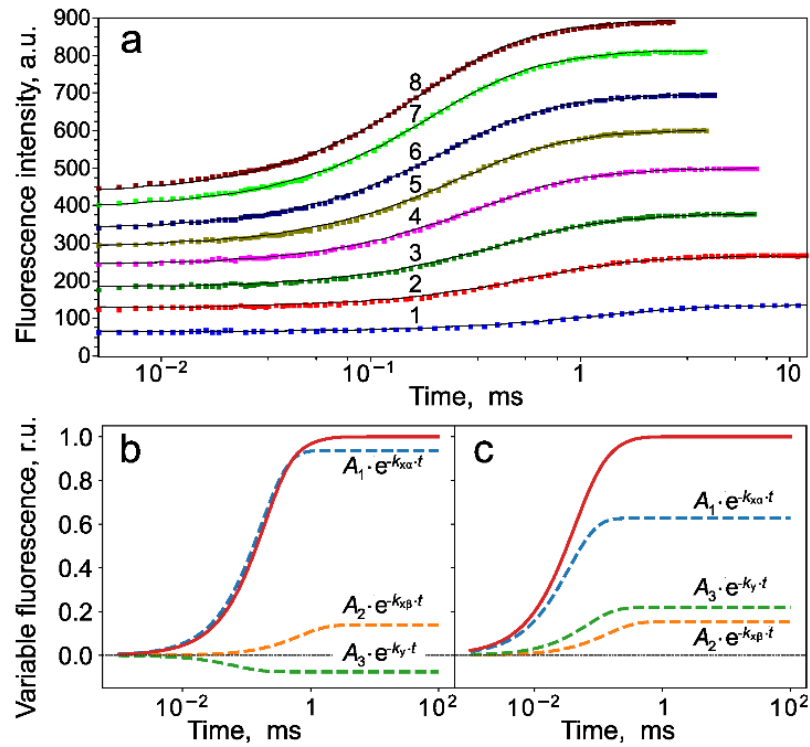


Рисунок 2.8 – Кривые индукции флуоресценции, полученные для клеток *Chlamydomonas* при добавлении DCMU: а – экспериментальные данные (точки) и модельные решения для параметров из таблицы 2.3 (линии), числа соответствуют различным интенсивностям актиничного света: 1 – 940, 2 – 1840, 3 – 2670, 4 – 3440, 5 – 4180, 6 – 4900, 7 – 5570 и 8 – 6230 $\text{мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$; б – вклад экспоненциальных фаз (зеленая, оранжевая и синяя кривые) в общее решение модели (красная кривая) при интенсивности актиничного света $I = 6230 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$; в – вклад экспоненциальных фаз (зеленая, оранжевая и синяя кривые) в общее решение модели (красная кривая) при интенсивности актиничного света $I = 30\,000 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$. [Plyusnina et al. 2024]

Однако при моделировании действия света большей интенсивности ($k_{La} \approx 2k_{s1-s2}$) каждая из трех экспоненциальных функций имеет достаточно большие положительные амплитуды (последний столбец в таблице 2.3, рис. 2.8в). При этом характерные времена этих функций заметно различаются, что при анализе с использованием метода комплементарной площади позволило бы идентифицировать три типа РЦ.

Таблица 2.3 – Параметры модели и их стандартные ошибки, полученные путем аппроксимации экспериментальных кривых на рисунке 2.8a

$I, \text{мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$	940	1840	2670	3440	4180		4900	5570	6230	30000***
	Параметры, полученные в результате аппроксимации кривых									
u_i	1*	1.96**	2.78**	3.68**	4.43**		5.13**	6.00**	6.59**	32***
$k_{\alpha}, \text{мс}^{-1}$										0.91±0.02
$k_{\beta}, \text{мс}^{-1}$										0.25±0.02
s										0.43±0.26
α										0.55±0.02
F_{ot}										0.48**
$k_{s1-s2}, \text{мс}^{-1}$										16.94±14.23
K_{pred}										28.0*
	Рассчитанные параметры									
$k_{\alpha} \cdot u_i, \text{мс}^{-1}$	0.91	1.78	2.53	3.35	4.03		4.67	5.46	6.00	29.12
$k_{\beta} \cdot u_i, \text{мс}^{-1}$	0.25	0.49	0.69	0.92	1.11		1.28	1.50	1.65	8.00
A_1	0.82	0.83	0.83	0.84	0.84		0.85	0.85	0.86	0.63
A_2	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18		0.18	0.19	0.19	0.20
A_3	-0.00	-0.01	-0.01	-0.02	-0.02		-0.03	-0.04	-0.04	0.17

*Фиксированное значение

**Стандартная ошибка менее 0,01

***Значения использовались только в моделировании.

Как и ожидалось, все наблюдаемые изменения формы кривой оказались связанными только с изменением скорости образования экситонов. Модель предполагает, что соотношение размеров антенн для реакционных центров ФСII α и PSII β у *Chlamydomonas* составляет приблизительно 3,6:1, что согласуется с оценками, сделанными в [de Marchin et al. 2014]. Следует отметить, что несмотря на то, что изменения параметра k_x связывались с изменениями размера антенны, это не означало, что альфа-центры с k_x в три раза большим, чем бета-центры, должны иметь втрое большее количество молекул хлорофилла в светособирающей антенне. Изменение параметра k_x отражает также изменение и в параметрах всех быстрых процессов, происходящих в реакционном центре ФСII. Таким образом, оцененный размер антенны является эффективным показателем для оценки различных скоростей первичных фотохимических реакций в реакционных центрах ФСII α и ФСII β . Оцененная доля активных КВК для *Chlamydomonas* составила 43%. Неожиданно малая доля активных КВК возможно обусловлена фотогетеротрофными условиями культивирования, в которых роль фотосинтеза может быть незначительной.

2.2.2.2 Влияние кратковременного нагрева на гетерогенность реакционных центров в клетках *Scenedesmus obliquus*

Для оценки влияния инактивации КВК на форму флуоресцентных переходных процессов, обработанных DCMU, были получены индукционные кривые из суспензии клеточной культуры клеток *Scenedesmus* после кратковременного нагрева. Известно, что такая обработка, в зависимости от температуры, приводит к частичной или полной инактивации КВК [Allakhverdiev et al. 2008]. Инактивация КВК не изменяет значение F_o , но приводит к уменьшению значения F_m . Однако в наших экспериментах [Plyusnina et al. 2024] при умеренных температурах наблюдалось небольшое увеличение как F_o , так и F_m (рис. 2.9 а). Это означало, что наблюдаемые изменения формы флуоресцентных переходных процессов не относятся исключительно к инактивации КВК. Предполагалось, что параметры разделения заряда в открытых (K_{oi}) и закрытых (K_{ci}) РЦ ФСII также могут изменяться под воздействием термической обработки. Остальные параметры модели считались общими для набора из пяти кривых, полученных после нагревания до разных температур. Соответствующий набор параметров модели представлен в таблице 2.4. Инактивация КВК сопровождается уменьшением сигмоидности начального участка индукционной кривой (рис. 2.9 б, в), что объясняется уменьшением значения отрицательного предэкспоненциального множителя A_3 , характеризующего активность КВК. Значения K_{oi} и K_{ci} уменьшаются после умеренного нагрева, но снова увеличиваются при $T = 46^\circ\text{C}$. Видно, что процент активных КВК падает со 100% при $T = 20^\circ\text{C}$ до 15% при $T = 43^\circ\text{C}$ и почти до нуля при $T = 46^\circ\text{C}$.

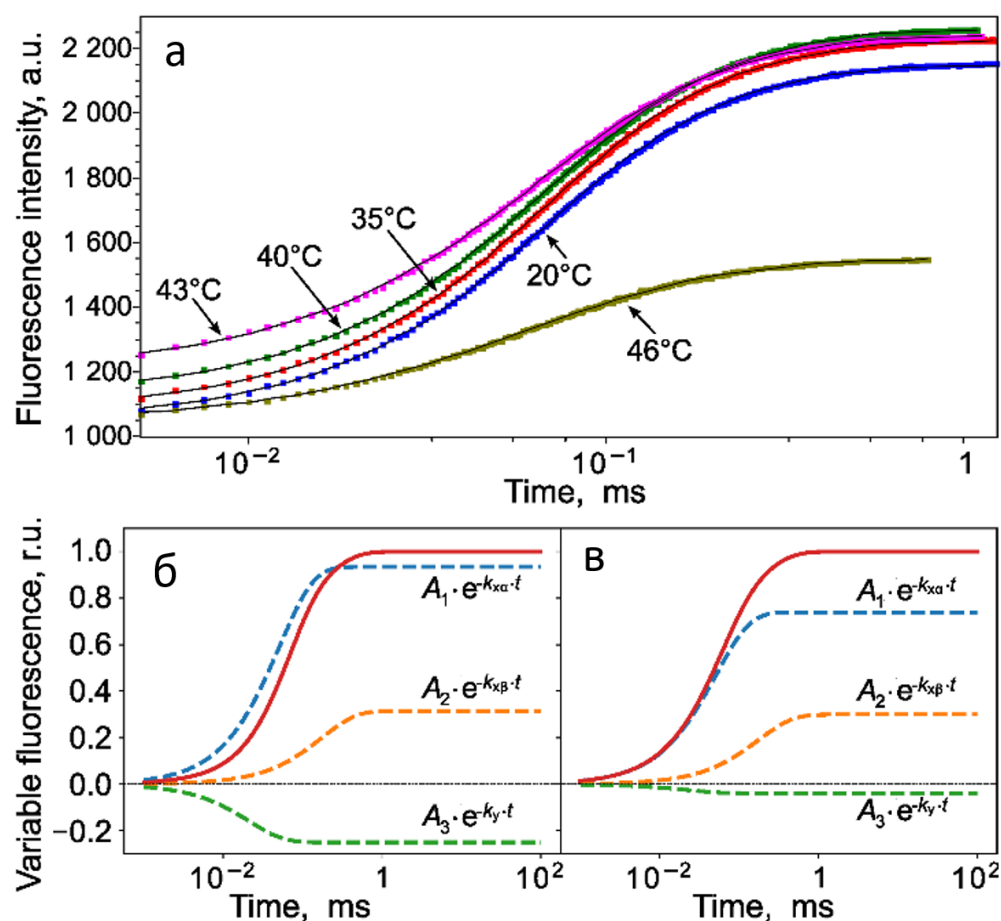


Рисунок 2.9 – Кривые индукции флуоресценции, полученные для образцов клеток *Scenedesmus*, обработанных DCMU после нагревания в течение 5 мин: а – экспериментальные данные (точки) и модельные решения для параметров из таблицы 2.4 (линии); б – вклад экспоненциальных фаз (зеленая, оранжевая и синяя кривые) в общее решение модели (красная кривая) при $T = 20^{\circ}\text{C}$; в – вклад экспоненциальных фаз (зеленая, оранжевая и синяя кривые) в общее решение модели (красная кривая) при $T = 46^{\circ}\text{C}$.

Таблица 2.4. – Параметры модели и их стандартные ошибки, полученные путем аппроксимации экспериментальных кривых на рисунке 2.9

T, °C	20°C	35°C	40°C	43°C	46°C
Параметры, полученные в результате аппроксимации кривых					
Koi	22.96±0.20	22.00±0.19	20.70±0.18	18.69±0.17	21.41±0.22
Kci	9.93*	9.51*	9.30*	9.09*	13.60*
s	0.97±0.24	0.90±0.24	0.84±0.24	0.15±0.23	<0.01**
α	0.58±0.01				
kL, мс ⁻¹	16.12±0.31				
kS1-S2, мс ⁻¹	21.50±2.24				
Kpred	28.0*				
Рассчитанные параметры					
A1	1.01	1.00	0.99	0.88	0.86
A2	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14
A3	-0.15	-0.14	-0.13	-0.02	0.00
kxα, мс ⁻¹	15.45	15.42	15.38	15.30	15.40
kxβ, мс ⁻¹	3.55	3.55	3.54	3.52	3.54
Fot	0.46	0.46	0.47	0.51	0.65

*Фиксированное значение

**Стандартная ошибка менее 0,01

В эксперименте с нагреванием и последующим охлаждением образцов *Scenedesmus* повышение температуры приводило к уменьшению значения F_m , при этом также уменьшается сигмоидность начального участка кривой, что согласуется с данными [Lazar, Pospisil 1999, Strasser 1997]. Согласно результатам аппроксимации, сигмоидность кривых, зарегистрированных без нагревания или после умеренного нагревания, обусловлена наличием дополнительной фазы с отрицательным вкладом в увеличение флуоресценции. Реакционные центры с неактивными КВК не проявляют этой фазы, поэтому уменьшение доли реакторных комплексов с активными КВК после высокотемпературной обработки снижает вклад этой фазы и, следовательно, уменьшает сигмоидность кривой. Изменение доли активных КВК, s , согласуется с данными по выделению кислорода, полученными в аналогичных условиях (Inoue et al. 2001). После высокотемпературной обработки (46 °C) значение F_o близко к значению, наблюдаемому без нагрева, а уменьшение значения F_m можно объяснить уменьшением доли реакционных центров с активными КВК. Однако инкубация образцов при более низких температурах (35–43 °C) приводит к довольно небольшому, но заметному увеличению как значений F_o , так и F_m . Для объяснения этих изменений, было сделано предположение, что K_{oi} и K_{ci} изменяются во время нагрева. Анализируя состав этих параметров с помощью элементарных констант, можно предположить, что при умеренных температурах кратковременный нагрев приводит к уменьшению констант разделения заряда в открытых и закрытых центрах, k_{1o} и k_{1c} , а при нагреве до высоких температур константы обратной реакции k_{-1o} и k_{-1c} могут увеличиваться, в результате чего K_{oi} и K_{ci} возвращаются к своим исходным значениям.

Предложенный подход к редукции детальной модели процессов переноса электронов в ФСII позволил получить модель, включающую три ключевых состояния ФСII. Модель является минимальной и достаточной для описания всех процессов, отраженных в кривой нарастания флуоресценции для образцов, обработанных DCMU. Модель позволяет выявить неочевидные взаимосвязи между формой переходного процесса флуоресценции хлорофилла *a* и

параметрами переноса электронов в реакционных центрах ФСII с учетом ее гетерогенности. Такая модель позволяет быстро оценить параметры светопоглощения ФСII и активности КВК и может быть использована в качестве инструмента для обработки больших массивов экспериментальных данных, например при экологическом мониторинге. Поскольку гетерогенность фотосинтетического аппарата необходима для его адаптации к неблагоприятным факторам окружающей среды, предложенный подход к анализу состояния фотосинтетического аппарата растений и микроводорослей может быть полезен как для понимания механизмов функционирования фотосинтетического аппарата, так и для решения прикладных задач.

2.3. Метод спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации (СМЭА) для анализа переходных процессов в ФСII по кривым индукции флуоресценции

Для экспресс-анализа фаз кривых индукции флуоресценции был разработан метод, основанный на мультиэкспоненциальном представлении кривых. Как было показано в предыдущих разделах различные состояния ФСII и переходы между ними могут быть описаны системой линейных дифференциальных уравнений. Решение линейной системы в общем случае можно представить в виде суммы экспоненциальных функций, число которых определяется количеством переменных. Значительное отличие характерных времен первичных реакций фотосинтеза позволяет выделить отдельные фазы на индукционной кривой. Каждая из фаз, отражающаяся на индукционной кривой, указывает группу реакций с соответствующими характерными временами.

Одним из наиболее распространенных способов анализа сигнала в самых разных областях исследований является его представление в виде спектра. Широко применяются такие методы, как Фурье анализ, преобразование Лапласа, использующие экспоненциальные функции с комплексными переменными. Поскольку мы исходили из модели, решение которой представляет сумму экспоненциальных функций для проведения спектрального анализа кинетика

индукции флуоресценции аппроксимировалась мультиэкспоненциальным рядом, при этом характерные времена τ_n были фиксированы:

$$F(t) = F_0 + \sum_{n=1}^N A_n (1 - e^{-t/\tau_n}), \quad (2.16)$$

где F_0 – минимальное значение на кривой индукции флуоресценции $F(t)$, A_n отражает вклад n -й экспоненты с характерным временем τ_n в общий сигнал, t – время. Характерные времена показательных функций $A_n(1 - e^{-t/\tau_n})$ выбирались на фиксированной логарифмической сетке с шагом k_{step} : $\tau_{n+1} = k_{\text{step}} \tau_n$.

Для демонстрации возможностей метода была рассмотрена модельная кривая, имитирующая реальный сигнал, для задания которой использовалась сумма пяти экспонент с заданными параметрами (рис. 2.10 а). На графике этой функции в логарифмическом масштабе по времени визуально выделяются три фазы, сходные с обычно наблюдаемыми на экспериментальных кривых фазами OJ, II и IP.

Результат аппроксимации входного сигнала $F(t)$ выражением (2.16) был представляет собой амплитудный спектр – набор амплитуд $A_n(\tau_n)$, распределенный по выбранным фиксированным временам τ_n (рис. 2.10 б). Полученный спектр имеет пять хорошо разрешенных отдельных полос с временами, близкими к характерным временам исходно заданных функций. Величины амплитуд вне полос приближаются к нулю и на графике визуально не обнаруживаются. Для оценки характерного времени фазы использовалось взвешенное среднее характерных времен экспонент, составляющих полосу. Сумма амплитуд A_n всех экспонент, составляющих каждую отдельную полосу, определяет амплитуду соответствующей фазы входного сигнала.

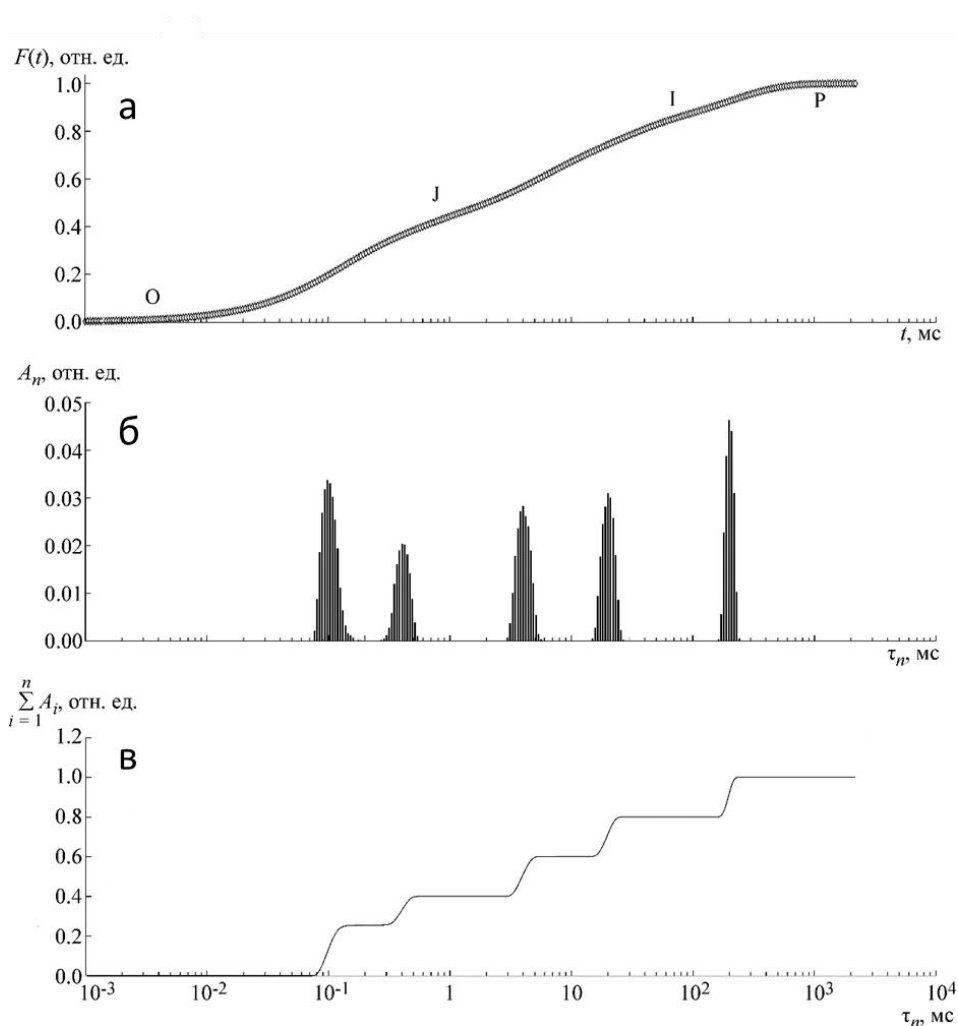


Рисунок 2.10 – Иллюстрация предлагаемого подхода для анализа кинетики модельных кривых, имитирующих экспериментальные кривые индукции флуоресценции: а – модельная кривая, построенная по формуле: $F(t) = \sum_{n=1}^5 A_n(1 - e^{-t/\tau_n})$, параметры указаны в таблице 2.5; б – спектр амплитуд $A_n(\tau_n)$, полученный при аппроксимации кривой $F(t)$ рядом из 300 экспонент $\sum_{n=1}^{300} A_n(1 - e^{-t/\tau_n})$, где $\tau_0 = 0.001$, а каждое последующее значение τ было рассчитано по формуле $\tau_{n+1} = k_{\text{step}} \tau_n$, $k_{\text{step}} = 1.05$; в – частичные суммы ряда $\sum_{i=1}^n A_i$, построенные на каждом шаге по времени τ_n . На всех графиках используется логарифмический масштаб времени.

Рассчитанные времена и амплитуды хорошо согласуются с параметрами функции, использованной для получения модельной кривой (табл. 2.5).

Таблица 2.5 – Параметры модельной кривой на рисунке 2.10 а.

Параметр		A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	τ_1	τ_2	τ_3	τ_4	τ_5
Заданное значение		0.25	0.15	0.20	0.20	0.20	0.10	0.4	4.0	20.0	200.0
Рассчитанное значение		0.259	0.141	0.201	0.199	0.200	0.10	0.41	4.06	20.02	200.3

Для визуализации результатов аппроксимации и идентификации отдельных фаз индукции флуоресценции по экспериментально полученным

данным было предложено использовать график зависимости частичных сумм $\sum_{i=1}^n A_i$ от соответствующих значений τ_n . Такой график (рис. 2.10 в) представляет собой ступенчатую функцию, позволяющую оценить амплитуды и характерные времена этих фаз. Частичные суммы амплитуд, рассчитанные на каждом шаге сетки, таким образом, дают общую картину наиболее значимых вкладов экспоненциальных функций, соответствующих различным фазам кривой индукции флуоресценции. Предложенный метод анализа данных индукции флуоресценции был реализован в виде модуля для пакета pyPhotoSyn. Для решения уравнения (2.16) использовался алгоритм Левенберга–Марквардта, реализованный в пакете SciPy.

Для визуализации большого числа данных, получаемых, например, при мониторинге, было разработано представление кривой в виде вертикальной полосы, разделенной на участки, соответствующие амплитудам фаз кривой которой и окрашенных в цвета, соответствующие характерным временам фаз кривой (рис. 2.11).

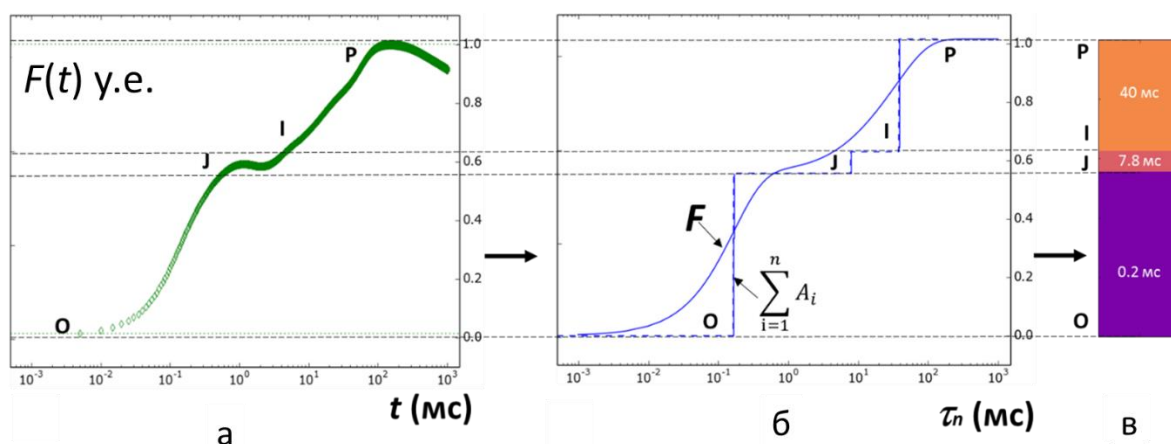


Рисунок 2.11 – Иллюстрация метода СМЭА: а – индукционная кривая $F(t)$ для *C.reinhardtii*; б – кривые после преобразования; F– кривая получена аппроксимацией суммы экспонент; $\sum_{i=1}^n A_i$ – ступенчатая функция получена вычислением на каждом шаге сетки частичных сумм амплитуд; в – визуализация фаз с помощью цвета; цвет полосы определяет характерное время соответствующей фазы, высота полосы – ее амплитуду.

Спектр характерных времен от 1 мкс до 1 с соответствует цветовой шкале от синего к желтому. В результате преобразования кривой (рис. 2.11 а) полученная ступенчатая функция (рис. 2.11 б), преобразуется в полосу, отдельные части которой раскрашены в цвета, соответствующие характерным

временам выделенных фаз, а высота соответствует амплитудам этих фаз (рис. 2.11 в). 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 pyPhotoSyn.

Таким образом, в данной главе сформирован методологический аппарат, в котором редуцированные модели и СМЭА являются дополняющими друг друга инструментами анализа переходных процессов в ФСII. Характеристики фаз кривой индукции флуоресценции интерпретируется как определенные группы процессов ФСII, изменение которых отражает механизмы регуляции, пороговые переходы и признаки гетерогенности ФСII. Эти методы составляют основу представленного в следующих главах диссертации анализа адаптационных процессов в условиях стресса.

2.4. Выводы по главе 2

1. Разработан иерархический подход, позволяющий корректно редуцировать кинетические модели ФСII, количественно описывать кривые индукции флуоресценции и оценивать элементарные константы переноса электронов путем «разворачивания» эффективных параметров.
2. Предложена редуцированная модель ФСII 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.

Результаты главы 2 представлены в работах:

1. 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.
2. Plyusnina T. Y., Khrushev S. S., Degtereva N. S., Voronova E. N., Volgusheva A. A., Riznichenko G. Y., Rubin A. B. Three-state mathematical model for the assessment of DCMU-treated photosystem II heterogeneity. // Photosynthesis Research. – 2024. – vol. 159. – no. 7. – pp. 303–320.
3. 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.
4. Antal T., Konyukhov I., Volgusheva A., Plyusnina T., Khrushev S., Kukarskikh G., Goryachev S., Rubin A. A chlorophyll fluorescence induction and relaxation system for the continuous monitoring of photosynthetic capacity in photobioreactors // Physiologia Plantarum. – 2019. – vol. 165. – no. 3. – pp. 476–486.
5. 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.
6. Demin O. V., Lebedeva G. V., Kolupaev A. G., Mogilevskaya E. A., Plyusnina T. Y., 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). Natural Computing Series. Springer, Berlin, Heidelberg. – 2004. – pp. 59–103.

Глава 3. Применение редуцированных моделей и метода СМЭА для анализа переходных процессов в условиях действия факторов стресса

В предыдущей главе были представлены методологические подходы для анализа переходных процессов в фотосинтезирующих организмах – редуцированные кинетические модели фотосистемы II (ФСII) и метод спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации (СМЭА), позволяющие связать изменения формы кривых индукции флуоресценции с элементарными биофизическими процессами. В данной главе эти методы применяются для анализа действия различных 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 возможности с помощью предложенных методов обнаруживать 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, такие как ЛР-тест, анализ разностных кривых и методы машинного обучения.

3.1. Анализ переходных процессов в растущей культуре *Chlorella vulgaris*, при истощении азота в среде

В данном разделе на основе анализа массива ИК, полученных для клеток водоросли *Chlorella vulgaris*, растущих в биореакторе, данных по изменению состава среды и спектральных характеристик исследуются переходные процессы в фотосинтетическом аппарате клеток при естественном истощении (выедании) азота в среде. Азот является одним из важнейших элементов минерального питания является, который входит в состав всех аминокислот, необходимых для синтеза белков клетки, а также присутствует в молекулах хлорофилла. Дефицит азота приводит к снижению содержания хлорофилла и важнейших для растительных клеток белков тилакоидной мембраны, входящих в комплексы

электрон-транспортной цепи хлоропластов – фотосистем I и II, цитохромного b_6f -комплекса и АТФ-синтазы, а также основного фермента, участвующего в фиксации CO_2 в темновой фазе фотосинтеза – рибулозодифосфаткарбоксилазы (рубиско) [Cetner et al. 2017]. В итоге это приводит к снижению эффективности процессов световой фазы, к генерации активных форм кислорода за счет избыточной световой энергии и подавлению цикла Кальвина [Chen et al. 2024]. Однако эти изменения проявляются на уровне пигментации и роста культуры с существенной задержкой. Азотное голодание приводит к постепенному истощению запасов азота в клетке, что сопровождается разборкой светособирающих комплексов, снижением содержания хлорофилла и изменением активности фотосинтетического

Основной целью данного исследования было выявление ранних изменений в реакционном центре ФСII культуры микроводорослей *Chlorella vulgaris* в фотобиореакторе при естественном истощении азота в среде. Для детального мониторинга всех стадий роста культуры, протекающих в течение относительно короткого времени (десятки часов), был выбран термофильный штамм с высокой скоростью роста. В работе [Плюснина и др. 2019] было показано, что истощение азота в среде является лимитирующим фактором, инициирующим изменения ФСII во время роста *Chlorella* на среде Тамия [Tamiya 1957]. Поэтому одной из задач было сравнение динамики параметров ОЛР-кривой во время роста культуры и изменения содержания нитратов в среде.

3.1.1. Оценка скорости деления клеток, содержания азота и хлорофилла

В течение первых 40 часов роста культуры хлореллы в фотобиореакторе количество клеток демонстрировало экспоненциальную зависимость от времени и удовлетворяло уравнению $y = 1,5 \cdot e^{0,08 \cdot t}$ (рис. 3.1а, черные ромбы и пунктирная кривая соответственно). Таким образом, время удвоения клеток на экспоненциальной фазе роста культуры было оценено как 9 часов. В течение этого периода изменение количества клеток хорошо коррелировало с индексом

количества клеток A_{725} , полученному из измерений поглощения света (рис. 3.1 а, белые кружки).

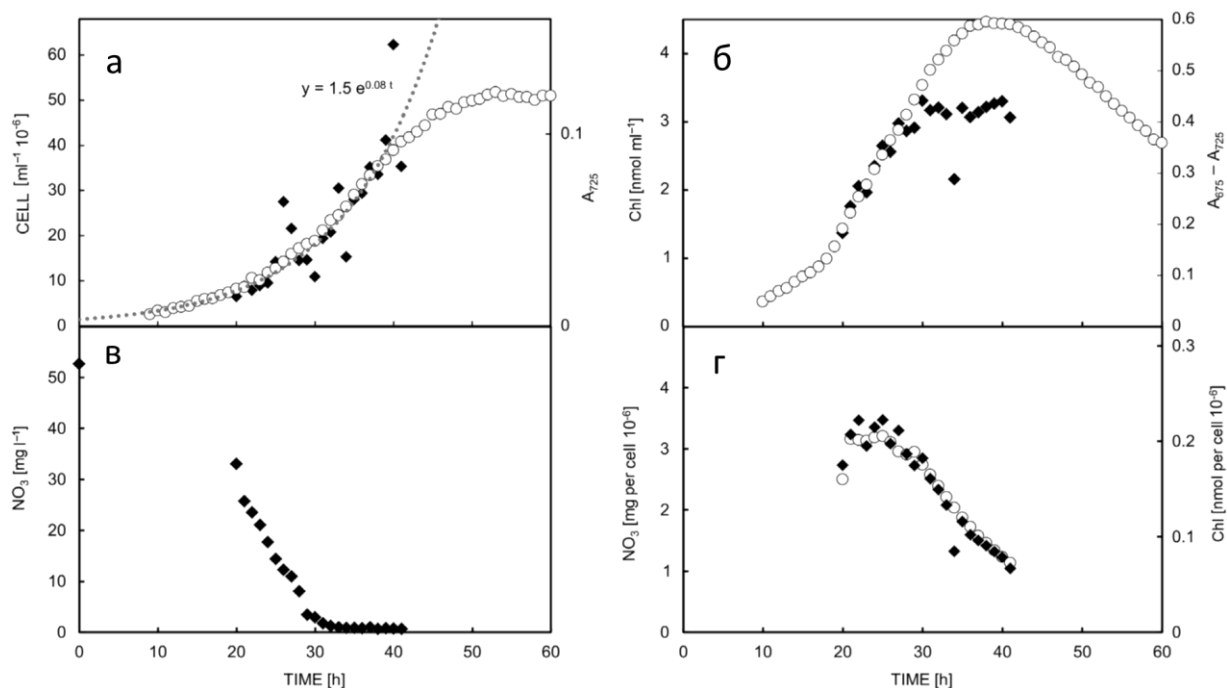


Рисунок 3.1 – Изменения плотности клеток, содержания хлорофилла и азота в процессе роста *Chlorella* в фотобиореакторе: а – количество клеток (черные ромбы), аппроксимация экспоненциальной функцией $y = 1,5 \cdot e^{0,08 \cdot t}$ (пунктирная кривая) и индекс количества клеток, оцененный как оптическая плотность клеточной суспензии при 725 нм (A_{725} , белые кружки); б – общее содержание хлорофилла *a* и *b* (черные ромбы) и его оценка (индекс содержания хлорофилла) по оптической плотности клеточной суспензии A_{675} , скорректированной с учетом рассеяния света ($A_{675} - A_{725}$, белые кружки); в – содержание нитратов в среде; г – содержание азота на клетку (белые кружки) и хлорофилла *a* и *b* (черные ромбы).

Изменение общего содержания хлорофилла в культуре (рис. 3.1 б, черные ромбы) совпадало с изменением индекса содержания хлорофилла $A_{675} - A_{725}$ (рис. 3.1 б, белые кружки) до 30 часов роста культуры. Затем общее содержание хлорофилла перестало увеличиваться, в то время как $A_{675} - A_{725}$ продолжало расти. По-видимому это было связано с так называемым эффектом упаковки: одинаковое количество хлорофилла приводит к более высокой абсорбции, когда молекулы пигмента упакованы более рыхло. Начальная концентрация KNO_3 в культуральной среде до инокуляции хлореллы составляла 52 мг/л. Она снижалась по мере роста культуры и приближалась к своему стационарному значению (0,7 мг/л) в течение 31 часа (рис. 3.1 в). В фазе экспоненциального роста содержание азота и хлорофилла на клетку (рис. 3.1 г, белые кружки и черные ромбы

соответственно) оставалось почти постоянным и начинало снижаться по мере истощения нитратов в среде, поскольку клетки продолжали делиться, и их количество увеличивалось. Содержание азота и хлорофилла на клетку снижалось почти в три раза до 41 часа культивирования. Следует отметить, что содержание хлорофилла на клетку снижалось с той же скоростью, что и содержание азота.

3.1.2. Оценка функциональной активности фотосинтетического аппарата с помощью JIP-теста

Кривые индукции флуоресценции хлорофилла регистрировались каждый час в течение 60 часов культивирования *Chlorella* в фотобиореакторе. С помощью программного обеспечения pyPhotoSyn были проанализированы изменения параметров JIP-теста по мере роста культуры. Максимальный квантовый выход первичной фотохимии $\phi_{Po} = F_v/F_m$ оставался почти постоянным (0,67) до 35 часов роста культуры, а затем медленно снижался примерно до 0,6 (через 42 часа) и меньше (рис. 3.2 а). Относительная переменная флуоресценция в J-фазе V_j постепенно увеличивалась до 29 часов, затем резко падала в течение 3 часов и снова начинала расти (рис. 3.2 б). Индекс производительности PI_{ABS} (рис. 3.2 в) достиг своего максимума (0,7) через 20 часов роста культуры (первая точка отсчета, когда стало возможным надежное определение параметров JIP-теста), затем постепенно снизился примерно до 0,3 через 29 часов и далее увеличился до 0,4 через 31 час, затем монотонно снизился до 0,2 через 45 часов и позже. Графики начального наклона флуоресцентного переходного процесса M_0 (рис. 3.2 г), нормированной комплементарной площади над переходным процессом O-J-I-P S_m (рис. 3.2 д) и квантового выхода электронного транспорта ϕ_{E0} (рис. 3.2 е) также показали две точки перегиба (через 29 и 32 часа роста культуры). Таким образом, были обнаружены два момента времени, когда динамика большинства параметров JIP-теста резко изменилась во время культивирования *Chlorella* – это 29-й и 32-й часы роста. При этом скорость увеличения переноса электронов ET_0/RC резко изменилась через 29 ч, (рис. 3.2 з), тогда как скорости увеличения как потока захваченной энергии TR_0/RC (рис. 3.2 ж) и потока рассеянной энергии

DI₀/RC (рис. 3.2 и) изменились через 32 ч. Повторяемость результатов в трех экспериментах подтвердила, что эти изменения были значимыми.

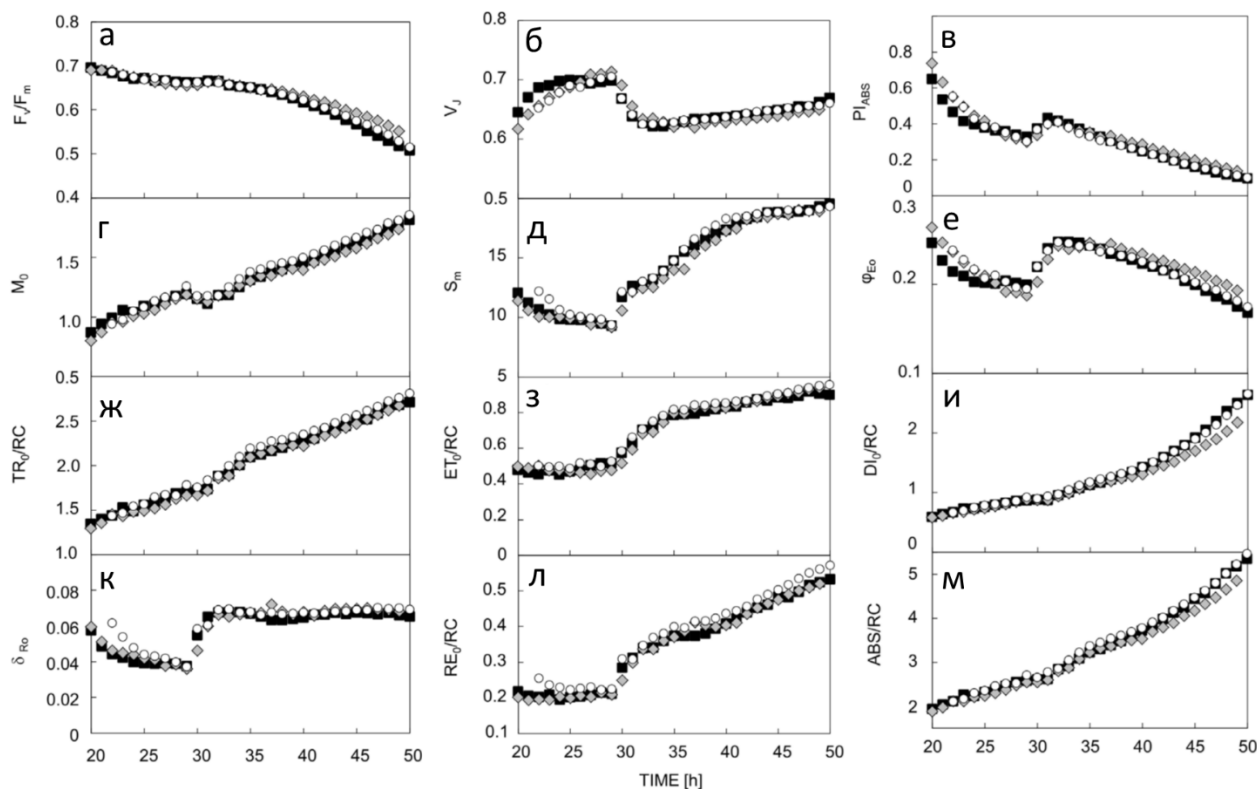


Рисунок 3.2 – Динамика параметров JIP-теста в процессе роста культуры *Chlorella* в фотобиореакторе. Кривые индукции флуоресценции хлорофилла *a* регистрировались после 3 минут темновой адаптации, интенсивность возбуждающего света составляла 3000 мкЭ м⁻² с⁻¹. Три повторности эксперимента показаны разными символами.

3.1.3. Оценка активности донорной стороны ФСП по разностным кривым индукции флуоресценции

Сравнение кривых индукции флуоресценции путем вычитания одной дважды нормированной кривой из другой помогает обнаружить изменения в начальной части кривой ОJIP, в частности, появление К-фазы [Kalaji et al. 2016]. Для выявления К-фазы во время роста культуры, были построены кривые индукции флуоресценции дважды нормированные по фазе О–J: $W_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_j - F_0)$ (рис. 3.3 а) согласно описанию в работе [Oukarroum et al. 2007]. Разница ΔW_{OJ} была рассчитана путем вычитания эталонного значения W_{OJ} из значения W_{OJ} , рассчитанного для последующих часов измерения индукционных кривых (рис. 3.3 б). В качестве эталонной кривой была взята усредненная индукционная кривая для трех повторностей эксперимента, относящихся к 23-му часу роста

культуры в фотобиореакторе. К этому времени плотность культуры достаточно выросла, поэтому флуоресцентные переходные процессы были записаны с минимальным шумом, и культура еще не начала голодать, поскольку в среде оставалось достаточное количество азота.

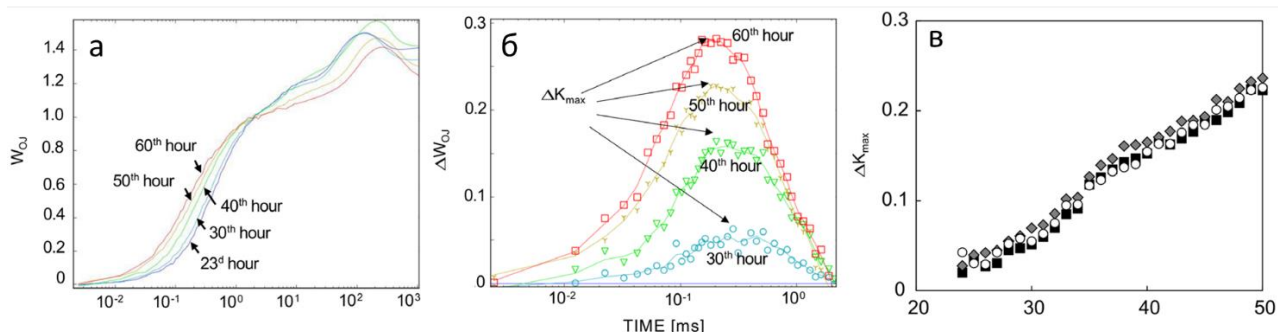


Рисунок 3.3 – Оценка амплитуды К-фазы по разностным кривым: а – индукционные кривые, нормированные по фазе OJ. $W_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$; б – разностные кривые. В качестве эталонной кривой W_{ref} была взята усредненная флуоресцентная переходная кривая для трех повторений эксперимента, записанная через 23 часа роста культуры в фотобиореакторе. $\Delta W_{OJ} = W_{OJ} - W_{ref}$; в – ΔK_{max} – максимальное значение соответствующего ΔW_{OJ} в интервале времени от 0 до 2 мс. Три повторности обозначены разными символами.

Каждая разностная кривая ΔW_{OJ} имеет максимум (К-пик) примерно на 250 мкс. Как правило, в литературе изменения К-пика описываются только качественно, как его увеличение или уменьшение. Для более удобной оценки изменения К-пика в случае большого экспериментального набора данных нами была введена его количественная оценка. Максимальное значение ΔW_{OJ} было обозначено как ΔK_{max} (рис. 3.3 б). Оценка ΔK_{max} для каждого часа роста культуры, позволила построить график его изменения (рис. 3.3 в) и таким образом оценить постепенные изменения активности кислородвыделяющего комплекса во время роста культуры микроводорослей. ΔK_{max} увеличивалось с начала наблюдения и демонстрировало некоторые немонотонные изменения через 35 часов роста культуры.

3.1.4. Уточнение фаз O-J-I-P с помощью анализа СМЭА

Анализ с помощью СМЭА показал, что в течение первых 35 часов культивирования индукционные кривые можно разложить на три экспоненциальных функции с характерными временами в диапазонах 0,4–0,5 мс, 2,6–4,2 мс и 55–130 мс, соответствующими типичным фазам OJ, JI, IP. Следует

отметить, что эти характерные времена относятся к моментам времени, когда флуоресценция примерно в 2,7 раза ниже, чем в стационарном состоянии соответствующей фазы, поэтому эти времена были значительно меньше, чем те, которые обычно используются для описания фаз кривой ОЛР. Дополнительная фаза с характерным временем около 250 мкс появилась после 35 часов роста культуры (рис. 3.4). Характерное время этой дополнительной фазы коррелирует со временем К-пика, обнаруженного путем анализа разностных кривых. Характерное время фаз ОJ и ОК в мультиэкспоненциальном приближении уменьшалось в процессе роста культуры, в то время как характерное время фаз Л и IP увеличивалось (рис. 3.4).

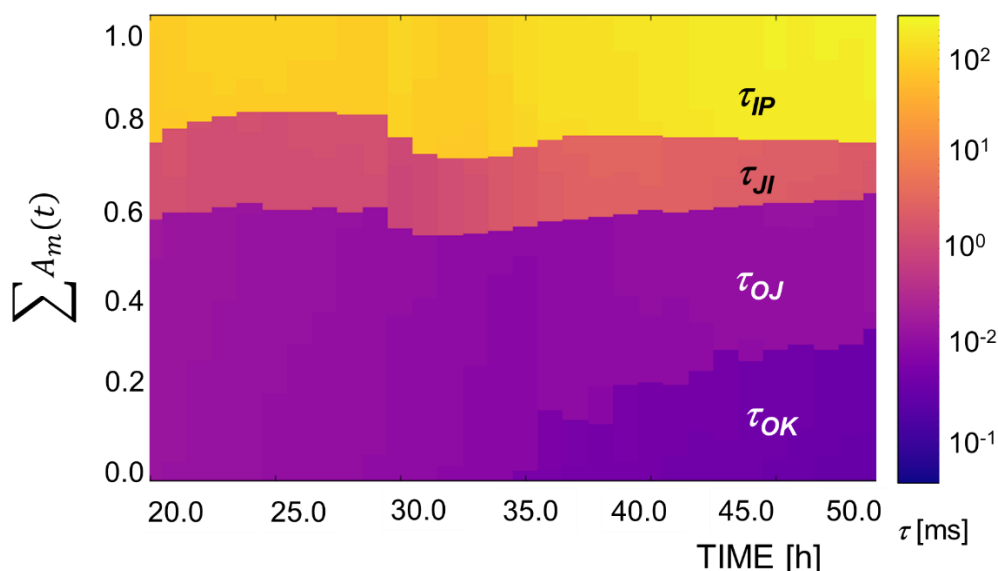


Рисунок 3.4 – Мультиэкспоненциальная аппроксимация кривых ОЛР для каждого часа роста культуры в фотобиореакторе. $\tau_{OK} \sim 0,15\text{--}0,25$ мс, $\tau_{OJ} \sim 0,4\text{--}0,5$ мс, $\tau_{LI} \sim 2,6\text{--}4,2$ мс, $\tau_{IP} \sim 55\text{--}130$ мс.

Анализ индукционных кривых, зарегистрированных во время роста культуры *Chlorella*, в сочетании с мониторингом истощения азота и содержания хлорофилла в клетках показал, что индукционные кривые могут служить чувствительным инструментом для характеристики процессов в фотосинтетическом аппарате, происходящих при истощении азота в среде. Почти полное истощение азота в среде произошло через 30 часов роста культуры, однако первые признаки стресса можно было обнаружить на несколько часов

раньше. Сочетая ЛР-тест, разностные кривые ΔW_{OJ} и СМЭА с традиционными методами химического анализа, было выявлено несколько качественно различных стадий роста культуры водорослей *Chlorella* в фотобиореакторе: экспоненциальный рост, акклиматизация к стрессу, клетки под действие стресса. Соответственно можно выделить три ключевых момента роста культуры: 29, 32 и 35 часов. В течение первой стадии (до 29 часов) в среде еще было достаточно азота, поэтому рост культуры оставался экспоненциальным. На этом этапе максимальный квантовый выход первичной фотохимии, ϕ_{P0} , оставался постоянным, однако показатель эффективности, PI_{ABS} , снижался из-за одновременного уменьшения ψ_0 (вероятность того, что электрон будет перенесен за пределы Q_A) и увеличения эффективной площади поперечного сечения антенны ABS/RC. Эти эффекты можно объяснить увеличением оптической плотности клеточной суспензии, что приводит к снижению средней освещенности в фотобиореакторе. Через 29 часов потребление нитрата из среды клетками практически прекратилось. Одновременно прекратился и биосинтез хлорофилла. Тем не менее, деление клеток продолжалось с той же скоростью, что привело к снижению содержания азота и хлорофилла на клетку. Более того, в интервале от 29 до 32 часов наблюдалось заметное увеличение параметров PI_{ABS} и ψ_0 , соответствующее увеличению эффективности фотосинтетического аппарата. Этот эффект можно объяснить уменьшением плотности реакционных центров (РЦ) ФСII в тилакоидной мембране, что приводит к увеличению размера пула пластохинона на один РЦ. Эта гипотеза подтверждалась резким увеличением площади над индукционной кривой S_m и δ_{R0} – вероятности переноса электронов от промежуточных переносчиков к ФСI. В течение этого периода эффективная площадь поперечного сечения антенны ABS/RC не изменялась. После 32 часов роста культуры эффективность фотосинтетического аппарата (параметр PI_{ABS}), снова начала снижаться. Это снижение было в основном результатом уменьшения максимального квантового выхода первичной фотохимии, ϕ_{P0} . Вероятно, на этом этапе восстановление поврежденных РЦ ФСII не удалось из-за нарушения синтеза белков и пигментов в условиях дефицита

азота. В то же время эффективная площадь поперечного сечения антенны ABS/RC начала увеличиваться, также, вероятно, из-за повреждения РЦ ФСII, что привело к увеличению числа антенных комплексов на каждый из оставшихся активных РЦ ФСII. Однако дополнительная световая энергия, захваченная увеличенной антенной, не может эффективно использоваться РЦ, поэтому рассеивание энергии DI_0/RC также увеличилось. Тем не менее, в интервале от 29 до 35 ч поток переноса электронов ET_0/RC увеличился почти вдвое, тогда как после 35 ч увеличение ET_0/RC замедлилось. Примерно в это время индекс содержания хлорофилла ($A_{675} - A_{725}$) достиг своего максимума и начал снижаться. В это же время на индукционных кривых появилась дополнительная быстрая фаза (К-фаза) с характерным временем около 0,25 мс (рис. 3.4), указывающая на ингибирование переноса электронов на донорной стороне ФСII. Можно предположить, что деградация ФСА в описываемых экспериментальных условиях началась с этого момента. Период с 29 по 35 час можно считать периодом акклимации. В течение этого периода ФС сохраняет способность справляться с дефицитом питательных веществ. Следует отметить, что продолжительность этого периода (около 6 часов) короче, чем время удвоения на экспоненциальной фазе (около 9 часов). Следовательно, наблюдаемое в это время увеличение числа клеток обусловлено делением клеток, которые начали деление до истощения азота в среде.

3.1.5. Использование модели для анализа гетерогенности реакционных центров ФСII индукционной кривой

С помощью разработанной в предыдущей главе математической модели (2.15) был проведен анализ изменения гетерогенности реакционных центров ФСII в процессе роста культуры при истощении азота в среде. Кривые индукции флуоресценции измерялись каждый час в процессе роста культуры при трех разных интенсивностях действующего света: 3440, 4900 и 6230 мкЭ м⁻²с⁻¹ на образцах, обработанных DCMU. Пример кривых для 29 ч. роста приведен на рисунке 3.5.

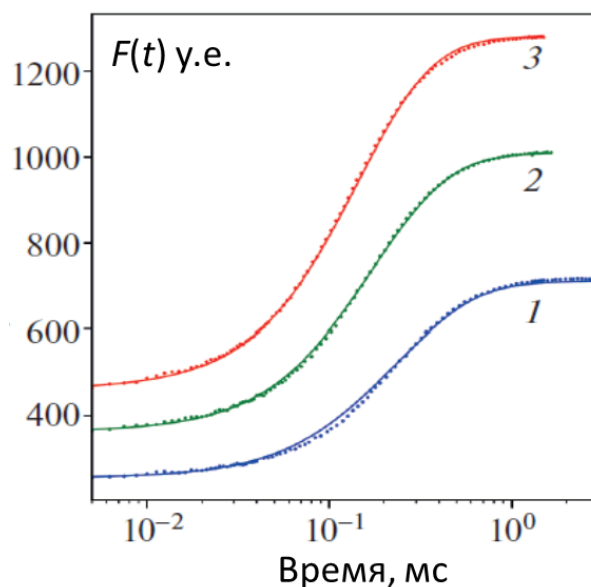


Рисунок 3.5 – Кривые индукции флуоресценции хлорофилла, измеренные в присутствии DCMU при действующем свете интенсивностью 3440 (кривая 1), 4900 (кривая 2), 6230 (кривая 3) $\mu\text{кЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$. Точки – экспериментальные данные, измеренные на 29-м ч роста культуры. Непрерывные кривые – результат аппроксимации экспериментальных данных с помощью модели.

Использование различных интенсивностей измерительного света позволило корректно идентифицировать параметры модели, поскольку серия таких кривых описывалась одним набором параметров за исключением констант ($k_{\alpha\alpha}$, $k_{\alpha\beta}$), которые менялись пропорционально интенсивности измерительного света. При идентификации параметров модели по сериям кривых, относящихся к разным стадиям роста культуры, предполагалось, что могут меняться доля альфа-центров (α) и эффективный размер светособирающей антенны альфа-центров ($k_{\alpha\alpha}$), доли активных КВК (s), а также отношение минимального F_0 и максимального F_M значений кривых, $F_{ot} = F_0/F_M$, характеризующее квантовый выход процессов диссипации энергии в реакционном центре ФСII. Эффективный размер светособирающей антенны бета-центров ($k_{\alpha\beta}$) предполагался одинаковыми на всех стадиях роста, поскольку он характеризует светосбор реакционных центров ФСII без присоединенных дополнительных светособирающих комплексов. При анализе активности КВК предполагалось, что изменение активности КВК связано только с изменением доли реакционных

центров ФСЦ с активным КВК (s), в то время как константа перехода КВК из S_1 в S_2 (k_y) и константа равновесия переноса электрона с тирозина-Z на P_{680} (K_{Pred}) в реакционных центрах с активным КВК не изменяются. Аппроксимация проводилась по всему набору экспериментальных данных с помощью программы DBSolve Optimum 2020 [Gizzatkulov et al. 2010], значения представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Параметры, полученные в результате аппроксимации экспериментальных кривых при помощи модели индукции флуоресценции, измеренных на разных часах роста культуры водорослей *Chlorella vulgaris* в условиях дефицита азота

	29 ч	31 ч	33 ч	35 ч	37 ч
F_{ot}	0,36**	0,36**	0,38**	0,38**	0,38**
K_{Pred}	1,08*	1,08*	1,08*	1,08*	1,08*
α	$0,81 \pm 0,03$	$0,75 \pm 0,02$	$0,74 \pm 0,02$	$0,70 \pm 0,02$	$0,67 \pm 0,01$
k_y	$28,45 \pm 0,73$	$28,45 \pm 0,73$	$28,45 \pm 0,73$	$28,45 \pm 0,73$	$28,45 \pm 0,73$
k_{xa}	$4,49 \pm 0,06$	$4,53 \pm 0,06$	$4,69 \pm 0,06$	$5,00 \pm 0,06$	$5,28 \pm 0,06$
k_{xb}	$1,27 \pm 0,06$	$1,27 \pm 0,06$	$1,27 \pm 0,06$	$1,27 \pm 0,06$	$1,27 \pm 0,06$
s	$0,84 \pm 0,04$	$0,78 \pm 0,04$	$0,57 \pm 0,03$	$0,54 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,02$
	39 ч	41 ч	43 ч	45 ч	47 ч
F_{ot}	0,38**	0,40**	0,42**	0,43**	0,45**
K_{Pred}	1,08*	1,08*	1,08*	1,08*	1,08*
α	$0,67 \pm 0,01$	$0,63 \pm 0,01$	$0,61 \pm 0,01$	$0,61 \pm 0,01$	$0,61 \pm 0,01$
k_y	$28,45 \pm 0,73$	$28,45 \pm 0,73$	$28,45 \pm 0,73$	$28,45 \pm 0,73$	$28,45 \pm 0,73$
k_{xa}	$5,16 \pm 0,06$	$5,57 \pm 0,07$	$5,88 \pm 0,08$	$6,14 \pm 0,08$	$6,30 \pm 0,09$
k_{xb}	$1,27 \pm 0,06$	$1,27 \pm 0,06$	$1,27 \pm 0,06$	$1,27 \pm 0,06$	$1,27 \pm 0,06$
s	$0,44 \pm 0,02$	$0,35 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,01$

Примечания: Значения k_y , k_{xa} , k_{xb} приведены для интенсивности действующего света $3400 \text{ мкЭ м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$;

* - стандартное отклонение не определялось;

** - значение стандартного отклонения $\sigma < 0,01$.

Доля альфа-центров (α), содержащих наибольшую по размеру антенну, включающую и периферическую, и внутреннюю части, спустя 18 ч после истощения азота в среде падает от 0,81 до 0,61 (на 25% от начального состояния), соответственно доля бета-центров (β), содержащих только внутреннюю антенну, увеличивается вдвое. Наибольшую чувствительность к отсутствию азота в среде

показал КВК: доля активных КВК (s) за 18 ч уменьшилась от 0,84 до 0,13 (на 85% по сравнению с начальным значением), то есть, за это время инактивировалась большая их часть. При анализе кривых индукции флуоресценции хлорофилла для культуры водорослей *Chlorella vulgaris* было выявлено снижение эффективности работы ФСII, выражающееся в возрастании F_{ot} (квантовый выход первичных фотохимических реакций, $F_v/F_M = 1 - F_{ot}$, при этом снижается). Снижение квантового выхода первичной фотохимии согласуется с полученными оценками в предыдущем разделе 3.5.4, которые были проведены с использованием ЛР-теста. Вероятно, это связано с нарушением синтеза белков и хлорофилла при недостаточном количестве соединений азота. Одними из важных механизмов, защищающих фотосинтетический аппарат от различных повреждений и связанных с ними негативных эффектов, являются синтез и замена поврежденных белков, прежде всего, белка D₁ – одной из кóровых субъединиц ФСII, которая наиболее подвержена светоиндуцированным повреждениям. Недостаток соединений азота в клетке существенно затрудняет использование этого защитного механизма. Снижение доли альфа-центров, содержащих и периферическую, и внутреннюю антенну, может быть вызвано ингибированием синтеза белков периферического антенного комплекса и хлорофилла в связи с недостатком азота. Другая возможная причина – отсоединение периферического антенного комплекса от ФСII и его миграция к фотосистеме I (state transition): что приводит к перераспределению энергии между фотосистемами и защищает ФСII от избыточного поглощения энергии и повреждения фотосинтетического аппарата. При исчерпании азота в среде наблюдается увеличение световой константы альфа-центров – параметра, характеризующего эффективное сечение поглощения света. Это явление, по-видимому, обусловлено нарушением синтеза белков и пигментов, что затрудняет репарацию поврежденных реакционных центров. Поскольку альфа-центры организованы как димеры, при инактивации одного из центров энергия светособирающей антенны полностью направляется на оставшийся активный

центр. В результате эффективное сечение поглощения на один активный реакционный центр возрастает.

Результаты, полученные с помощью редуцированной математической модели, в целом согласуются с оценками, проведенными в разделе 3.1.4 с помощью широко применяемого ЛР-теста (метода, основанного на интерпретации значений флуоресценции в выбранных точках индукционной кривой и комбинации таких значений). Однако ЛР-тест дает некие усредненные характеристики изменений для всех реакционных центров ФСII, тогда как математическая модель позволила выявить группы реакционных центров, различающихся по размеру светособирающей антенны и активности КВК, и описать изменение выявленной гетерогенности реакционных центров ФСII в процессе роста культуры в среде с дефицитом азота.

Таким образом, был проведен комплексный анализ фотосинтетической активности на фоне дефицита азота в периодической культуре термофильного штамма *Chlorella vulgaris*. Регистрация индукционных кривых каждый час в течение длительного периода роста микроводорослей *Chlorella* и комплексный анализ постепенных изменений в ФСII позволили выявить переходные процессы и определить ключевые точки метаболической перестройки во время естественного истощения азота в среде. Были обнаружены три ключевых точки в кинетике параметров фотосинтеза. Сразу после наступления дефицита азота в среде обнаруживается небольшой быстрый рост эффективности ФСII. В течение этого периода ФС справляется со стрессом путем снижения плотности реакционных центров ФСII в тилакоидных мембранах и одновременного увеличения эффективного поперечного сечения светособирающей антенны, при этом клетки продолжают делиться. Дальнейший дефицит азота приводит к деактивации кислородвыделяющего комплекса и снижению общего электронного транспорта. Комплексное применение разработанного нами метода СМЭА с анализом дифференциальных кривых ΔW_{OJ} и ЛР-тестом позволило выявить визуально не наблюдаемые ранние признаки стресса. Модель показала себя эффективным инструментом, обладающим высокой чувствительностью и

информативностью при анализе гетерогенности состояний ФСII в ответ на действие такого стресса, как азотного голодание: гетерогенность ФСII возрастала, что может рассматриваться как адаптивная перестройка, направленная на снижение фотоповреждения при ограниченном синтезе белков. Предложенный подход комплексного использования методов регистрации и анализа индукционных кривых может применяться как в фундаментальных исследованиях, так и при решении практических задач управления ростом культуры микроводорослей в биотехнологии – в частности, с целью определения оптимальных режимов выращивания микроводорослей для получения определенных целевых продуктов.

3.2. Анализ переходных процессов в растущей культуре *Chlorella vulgaris* при действии токсикантов

В данном разделе на основе анализа массива ИК, полученных для клеток водоросли *Chlorella vulgaris*, растущих в биореакторе, исследуются переходные процессы в фотосинтетическом аппарате клеток при действии солей кадмия и хрома, $K_2Cr_2O_7$ и $CdSO_4$.

3.2.1. Оценка показателей оптической плотности

Хлорофилл играет ключевую роль в процессе фотосинтеза, поглощая кванты света для последующего преобразования в энергию химической связи. Изменения содержания хлорофилла могут отражать физиологическое состояние растения, его адаптацию к условиям окружающей среды и эффективность фотосинтетической активности, поэтому в данном исследовании также, как при действии азотного голодания, были проведены соответствующие оценки. Изменение общего содержания хлорофилла в культуре коррелирует с изменением индекса $A_{675}-A_{725}$ во время роста культуры (рис. 3.6 б). На ранней стадии культивирования наблюдался экспоненциальный рост хлорофилла, который затем переходил в линейную фазу. При добавлении токсикантов в концентрации 20 мкМ рост хлорофилла оставался линейным, но немного замедлялся по сравнению с контролем. Добавление токсикантов в концентрации 50 мкМ приводило к резкому снижению скорости накопления хлорофилла в

течение первых часов для $K_2Cr_2O_7$ и почти полному прекращению роста для $CdSO_4$.

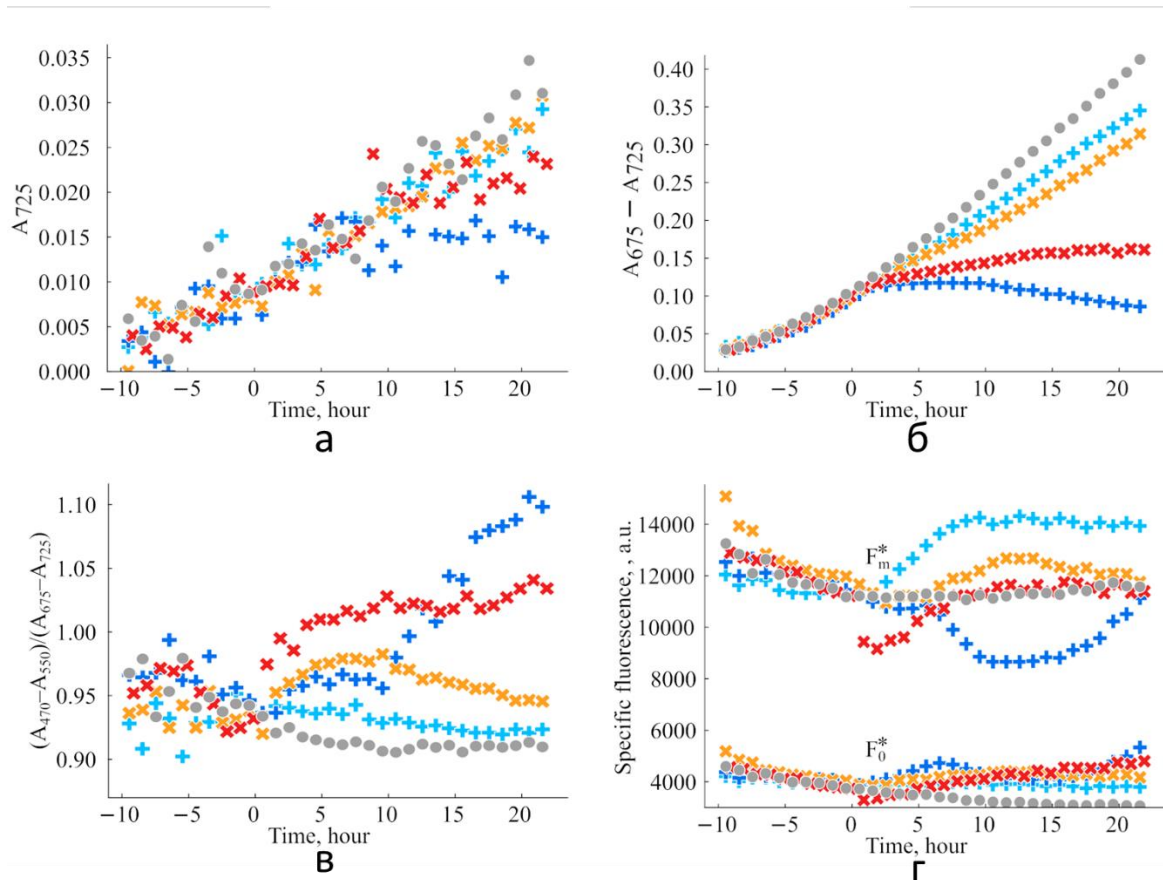


Рисунок 3.6 – Зависимость параметров, характеризующих рост культуры от времени инкубации клеток *Chlorella*: а – изменение оптической плотности A_{725} , характеризующее рост культуры; б – разница оптических плотностей ($A_{675} - A_{725}$), характеризующая содержание хлорофилла; в – отношение $(A_{470} - A_{550})/(A_{675} - A_{725})$, характеризующее отношение содержания каротиноидов к содержанию хлорофилла; г – удельные интенсивности флуоресценции, $F_0^* = F_0/(1 - 10^{-0.2(A_{455} - A_{725})})$, $F_m^* = F_m/(1 - 10^{-0.2(A_{455} - A_{725})})$. Цвета: серый – контроль, голубой – $CdSO_4$ (20 мкМ), синий – $CdSO_4$ (50 мкМ), оранжевый – $K_2Cr_2O_7$ (20 мкМ), красный – $K_2Cr_2O_7$ (50 мкМ).

Как было показано [Плюснина и др. 2019, 2020, Пирутин и др. 2025], чувствительным параметром к стрессовым факторам является отношение $(A_{470} - A_{550})/(A_{675} - A_{725})$, которое характеризует отношение содержания каротиноидов к содержанию хлорофилла. Анализ показал, что увеличение доли каротиноидов происходило под воздействием всех протестированных токсикантов, но в различной степени (рис. 3.6 в). Наименьшее увеличение наблюдалось для $CdSO_4$ (20 мкМ), а наибольшее – для $CdSO_4$ (50 мкМ). Другие параметры, чувствительные к действию стресса – это специфические значения минимальной

и максимальной флуоресценции, $F_0^* = F_0 / (1 - 10^{-0.2(A_{455} - A_{725})})$, $F_M^* = F_M / (1 - 10^{-0.2(A_{455} - A_{725})})$, полученные путем деления исходных значений F_0 и F_M на оптическую плотность суспензии при длине волны возбуждения флуоресценции 455 нм [Пирутин и др. 2025]. Эта нормализация устраняет очевидную зависимость и от количества клеток и содержания пигмента в культуре. Небольшое снижение F_0^* и F_M^* в контроле (рис. 3.6 г) отражало адаптацию культуры к условиям роста после переноса в биореактор. После добавления токсикантов в концентрации 50 мкМ наблюдалось увеличение F_0^* , указывающее на появление закрытых реакционных центров, и уменьшение F_M^* , что предполагает усиление нефотохимического тушения. Такие изменения типичны для стрессовых условий. Однако добавление токсикантов в концентрации 20 мкМ вызывает нетипичную реакцию: увеличиваются как F_0^* , так и F_M^* , что, вероятно, связано с появлением молекул хлорофилла, не связанных с реакционными центрами фотосистемы, что влияет как на уровень F_0^* , так и на уровень F_M^* (подобные изменения наблюдались при азотном голодании [Плюснина и др. 2019]). Измерение спектров поглощения во время роста культуры в фотобиореакторе позволило отслеживать динамику роста культуры и содержание пигментов. Как было показано ранее [Plyusnina et al. 2020], увеличение числа клеток в фазе линейного роста хорошо коррелирует с изменениями A_{725} . Данные A_{725} (рис. 3.6 а) указывают на то, что добавление токсикантов в низких концентрациях мало влияет на рост культуры, тогда как при высоких концентрациях рост культуры прекращается через 10 часов для $K_2Cr_2O_7$ и через 5 часов для $CdSO_4$.

3.2.2 Использование JIP-теста и методов машинного обучения (PCA) для оценки влияния токсикантов

Для изучения изменений в отдельных частях ЭТЦ были проанализированы изменения формы индукционной кривой с использованием параметров JIP-теста. Весь набор данных состоял примерно из 1800 параметров (12 параметров для каждого из ~150 кривых). Для визуализации структуры этого набора данных и выявления возможных групп со схожими характеристиками был использован метод главных компонент (PCA), который позволил получить комбинации

исходных 12 параметров – главных компонент, новых некоррелированных признаков, отражающих наибольшие различия между кривыми. Первая главная компонента (PCA_1) объясняла примерно 80% общей дисперсии в исходных данных, в то время как вторая компонента (PCA_2) – около 15%. Следовательно, двумерное подпространство, образованное первыми двумя главными компонентами, описывало примерно 95% общей изменчивости признаков, что позволило ограничить дальнейший анализ этими двумя главными компонентами. В пространстве двух главных компонент (рис. 3.7 а), где каждая точка соответствует одной индукционной кривой, выделяются несколько групп: 1) контроль и $CdSO_4$ (20 мкМ), 2) $K_2Cr_2O_7$ (20 и 50 мкМ), 3) $CdSO_4$ (50 мкМ). Полученные группы отличаются от тех, которые можно было бы ожидать, исходя из обычной логики (контроль, низкие концентрации токсикантов, высокие концентрации токсикантов). Это может указывать на то, что при низких уровнях токсикантов наблюдается не просто меньший эффект, но и качественно иной механизм действия. Усредненные переходные процессы, нормированные по F_0 , визуально собираются в те же группы (рис. 3.7 б), что и в пространстве главных компонент (рис. 3.7 а).

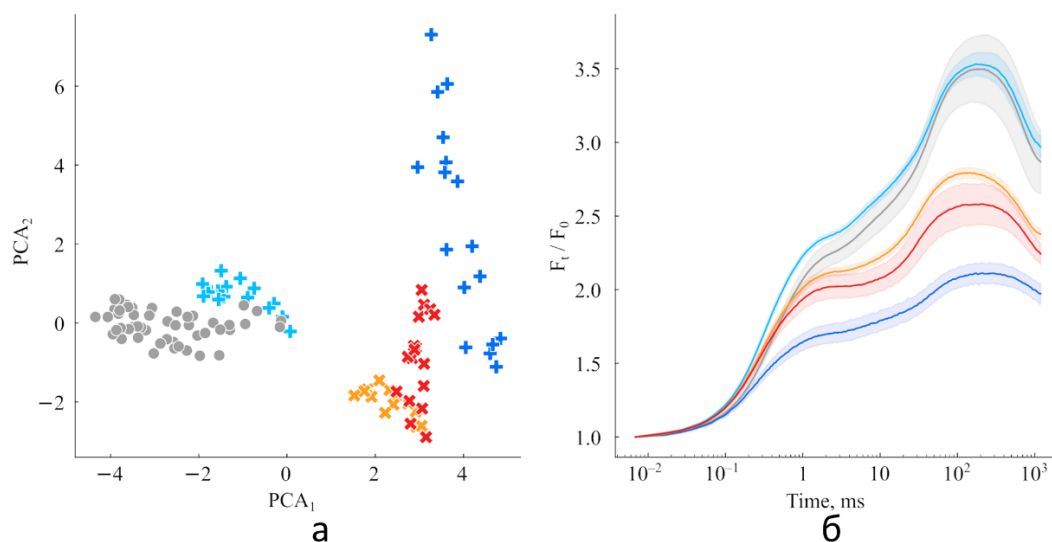


Рисунок 3.7 – Визуализация массивов данных: а – с использованием метода PCA (каждая точка соответствует отдельному переходному процессу флуоресценции хлорофилла); б – с использованием усредненных переходных процессов флуоресценции хлорофилла, нормированных как F_t/F_0 . Цвета: серый – контроль, голубой – $CdSO_4$ (20 мкМ), синий – $CdSO_4$ (50 мкМ), оранжевый – $K_2Cr_2O_7$ (20 мкМ), красный – $K_2Cr_2O_7$ (50 мкМ). Заштрихованные области указывают стандартные отклонения для соответствующих кривых.

Для выявления переходных процессов была исследована динамика параметров индукционной кривой в ответ на действие токсикантов. На первом шаге была проанализирована динамика главных компонент (рис. 3.8). Этот анализ позволил выделить основные характеристики наблюдаемых изменений в процессе культивирования, игнорируя при этом второстепенные. Из динамики главных компонент можно выделить два характерных паттерна: динамика PCA_1 (рис. 3.8 а) отражает довольно резкие изменения в течение первых нескольких часов после добавления всех токсикантов (за исключением $CdSO_4$ (20 мкМ)), за которыми следует почти стационарное поведение, тогда как динамика PCA_2 (рис. 3.8 б) демонстрирует ее постепенное и устойчивое увеличение.

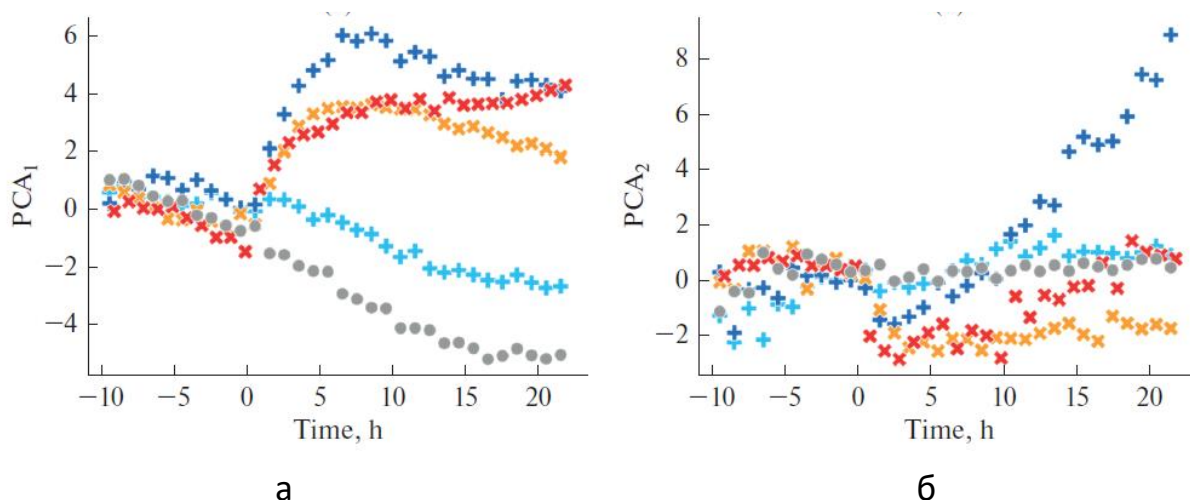


Рисунок 3.8 – Изменения главных компонент во времени в течение инкубации: а – PCA_1 ; б – PCA_2 ; точка 0 ч соответствует моменту добавления токсиканта. Цвета: серый – контроль, голубой – $CdSO_4$ (20 мкМ), синий – $CdSO_4$ (50 мкМ), оранжевый – $K_2Cr_2O_7$ (20 мкМ), красный – $K_2Cr_2O_7$ (50 мкМ).

Выявление этих двух паттернов облегчает анализ динамики исходных 12 параметров ЛР-теста и указывает, какие на какие конкретные изменения следует обратить внимание при визуальном анализе этих 12 параметров (рис. 3.9). Динамика PCA_1 (рис. 3.8 а) наиболее близка к динамике показателя эффективности PI_{ABS} (рис. 3.9 в), одного из ключевых параметров, отражающих общую жизнеспособность клетки, график которого практически является зеркальным отражением графика PCA_1 . К параметрам с аналогичной динамикой также относятся DI_0/RC (диссипация энергии в реакционном центре) (рис. 3.9 л),

V_J (характеризующий долю Q_B -невосстанавливающих центров) (рис. 3.9 д) и M_0 (характеризующий донорную сторону ФСII) (рис. 3.9 ж). Динамика второй главной компоненты (рис. 3.8 б) наиболее близко напоминает динамику R_{E0}/RC (поток электронов, восстанавливающий конечные акцепторы электронов в ФСI) (рис. 3.9 и).

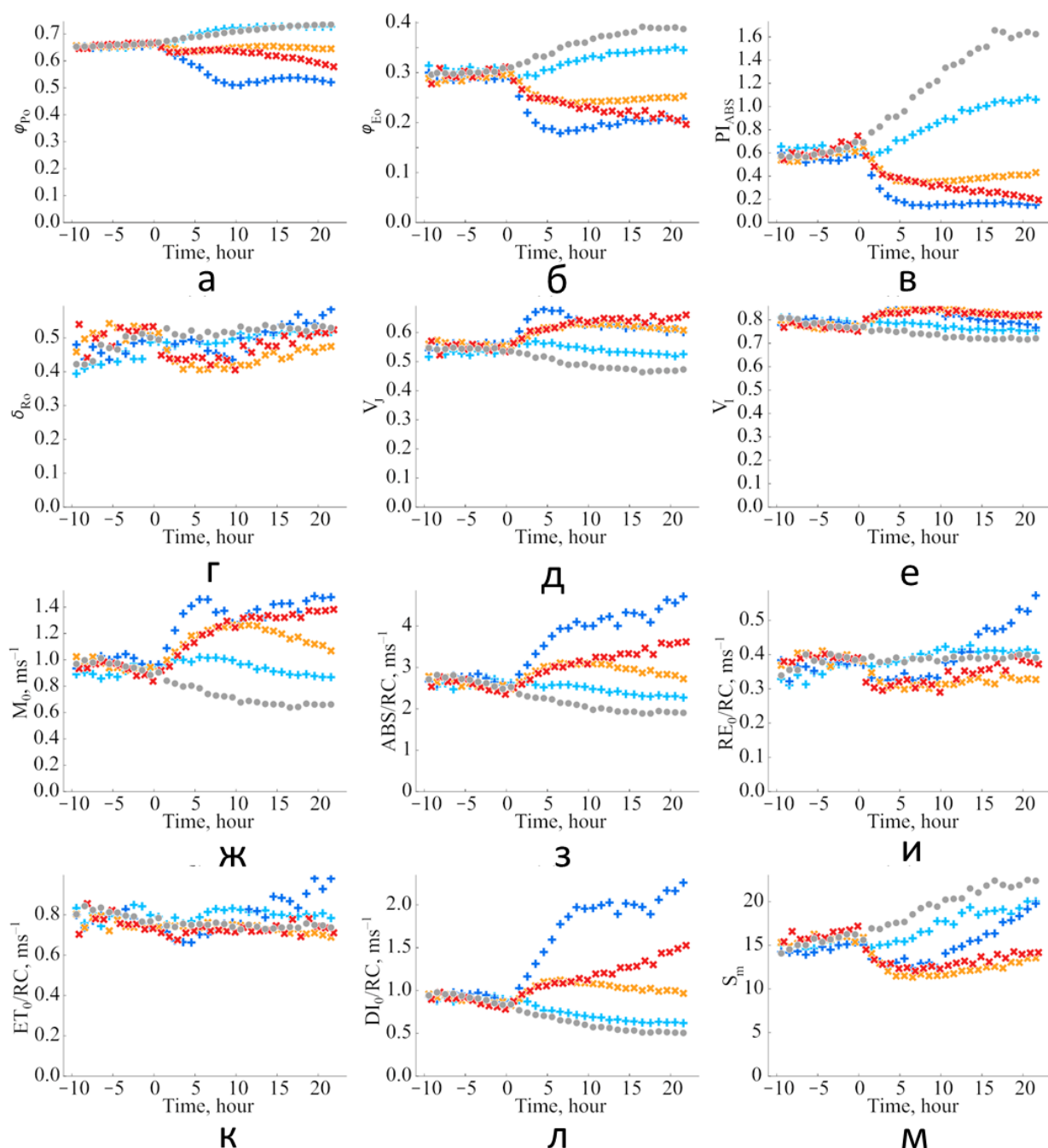


Рисунок 3.9 – Изменения параметров ЛП-теста во времени в процессе инкубации водорослей в присутствии токсикантов; точка 0 ч соответствует моменту добавления токсиканта. Цвета: серый – контроль, голубой – $CdSO_4$ (20 мкМ), синий – $CdSO_4$ (50 мкМ), оранжевый – $K_2Cr_2O_7$ (20 мкМ), красный – $K_2Cr_2O_7$ (50 мкМ).

Таким образом, изменения в функционировании отдельных частей ЭТЦ могут происходить как резко, так и постепенно, в зависимости от концентрации и типа токсиканта. На следующем шаге были рассмотрены изменения, происходящие в группах, идентифицированных с помощью метода главных компонент (переходные процессы с наиболее схожими характеристиками).

Группа 1, Контроль и CdSO_4 , 20 мкМ. Изменения, вызванные добавлением CdSO_4 в концентрации 20 мкМ, не выявляют каких-либо критически значимых изменений в индукционных кривых и, соответственно, в функционировании ФСЦ. Наблюдается незначительное снижение индекса производительности (PI_{ABS}) (рис. 3.9 в), в то время как другие параметры остаются практически неизменными, что указывает на слабое токсическое действие CdSO_4 в концентрации 20 мкМ.

Группа 2, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ при концентрациях 20 мкМ и 50 мкМ. Хотя токсикант в этой группе использовался в разных концентрациях, его эффекты в течение первых 10 часов схожи – динамика почти всех параметров ЛР-теста за этот период совпадала (рис. 3.9): индекс производительности PI_{ABS} снижался; поток электронов, восстанавливающий конечные акцепторы электронов в ФСЦ, $\text{R}_{\text{E0}}/\text{RC}$, уменьшался; и диссипация энергии в реакционном центре, DI_0/RC , увеличивалась. Однако после 10 часов воздействия $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ динамика параметров для 20 и 50 мкМ начинает отличаться. В случае $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (20 мкМ) параметры мало изменялись в последующие часы роста культуры (или начинали приближаться к контрольным значениям), что предполагает, что культура адаптировалась к действию низкой концентрации $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ или что токсикант, вероятно, перешел в менее токсичную форму – Cr^{3+} . Напротив, начиная примерно с 10-го часа воздействия, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (50 мкМ) вызывает постепенное снижение показателя эффективности PI_{ABS} и увеличение потока энергии на реакционный центр (ABS/RC) и диссипации (DI_0/RC), что указывает на развитие токсического эффекта.

Группа 3, CdSO_4 , 50 мкМ. Воздействие CdSO_4 в высокой концентрации вызывает наиболее значительные изменения параметров ЛР-теста. В течение первых 8–10

часов динамика параметров аналогична таковой в группе 2, но значения параметров изменяются в большей степени: индекс производительности PI_{ABS} снижался более резко, в то время как потоки ABS/RC и DI_0/RC увеличивались до более высоких уровней. В течение следующих ~ 8 часов параметры PI_{ABS} , ABS/RC и DI_0/RC стабилизировались, но поток электронов, восстанавливающий конечные акцепторы электронов на ФЦИ, R_{E0}/RC , начинал активно увеличиваться (рис. 3.9 и). На заключительном этапе наблюдений параметры ABS/RC и DI_0/RC снова начинали расти, а R_{E0}/RC продолжал увеличиваться, что в совокупности указывает на развитие сильного токсического эффекта.

3.2.3. Анализ влияния стрессовых факторов с использованием метода разностных кривых

Сравнение флуоресцентных переходных процессов путем вычитания одной дважды нормированной кривой из другой помогает обнаружить изменения в начальной части кривой ОЛР, в частности, появление К-фазы. Для выявления динамики К-фазы во время роста культуры были построены графики разностных кривых, дважды нормированных по фазе О–J, как $W_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$ (рис. 3.10 а–к), как описано в [Oukarroum et al. 2007, Kalaji et al. 2016].

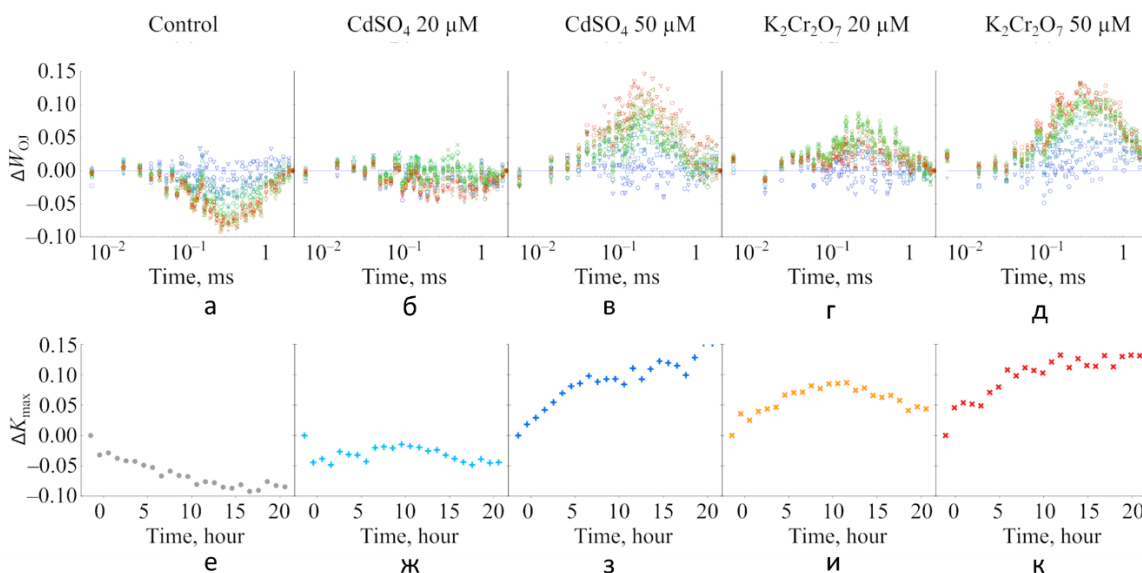


Рисунок 3.10 – Оценка амплитуды К-фазы по разностным кривым: а–д – Разностные кривые, нормированные по фазе ОJ; е–к – ΔK_{max} , максимальное значение соответствующего ΔW_{OJ} в интервале времени от 0 до 2 мс. Цвета кривых ΔW_{OJ} от синего до красного указывают на изменение ответа во времени.

Кривая, измеренная непосредственно перед добавлением токсиканта, была взята в качестве эталонной кривой W_{ref} . Разности ΔW_{OJ} были построены путем вычитания W_{OJ} эталонной из W_{OJ} , рассчитанной для индукционных кривых, зарегистрированных в каждый последующий час роста культуры: $\Delta W_{\text{OJ}} = W_{\text{OJ}} - W_{\text{ref}}$. Каждая из этих разностей имела максимум (К-пик) или минимум (для роста культуры без токсикантов) при ~ 250 мкс. Как и в предыдущем разделе, максимальное значение ΔW_{OJ} было обозначено как ΔK_{max} и представлено на графиках (рис. 3.10 е–к), таким образом, были оценены постепенные изменения на донорской стороне ФСII в процессе роста микроводорослей. ΔK_{max} значительно увеличивался под воздействием токсикантов в высоких концентрациях, оставался практически неизменным под действием CdSO_4 (20 мкМ) и изменялся немонотонно под воздействием $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (20 мкМ). Влияние CdSO_4 при низких концентрациях (20 мкМ) не вызывал существенных изменений (рис. 3.10 б, ж), тогда как при повышенной концентрации 50 мкМ наблюдалось выраженное увеличение интенсивности индукции флуоресценции на начальном участке графиков (рис. 3.10 в, з), что указывает на возможное накопление состояний ФСII, в которых преобладает окисленная форма P_{680}^+ . Это, вероятно, может быть связано с повреждением донорной стороны ФСII, электроны не могут полностью восстановить все молекулы P_{680}^+ . Аналогичный эффект наблюдался и для $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (50 мкМ) (рис. 3.10 д, к). Влияние $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ при низких концентрациях (20 мкМ) характеризуется немонотонной динамикой: первоначальное увеличение К-пика в течение примерно 10 часов сменяется снижением до контрольного уровня (рис. 3.10 г, и). Эта динамическая картина, вероятно, отражает процессы восстановления донорной стороны реакционного центра в ответ на незначительные повреждения, вызванные низкими концентрациями $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

3.2.4. Анализ влияния токсикантов с использованием математической модели

Для анализа гетерогенности РЦ с точки зрения размера светособирающего антенного комплекса и активности ФСII использовалась упрощенная модель

фотосистемы II (2.15), представленная в предыдущей главе, описывающая динамику индукции флуоресценции под действием DCMU (ингибитора переноса электронов от Q_A к Q_B). В процессе идентификации параметров модели предполагалось, что под воздействием токсикантов может изменяться доля α -центров (α) и их световые константы ($k_{\alpha\alpha}$), а также доли активных кислородвыделяющих комплексов (s), в то время как константа равновесия переноса электронов от тирозина к P_{680} (K_{Pred}), константа перехода кислородвыделяющего комплекса из состояния S_1 в состояние S_2 (k_y) и световая константа для β -центров ($k_{x\beta}$) остаются неизменными. Экспериментальные кривые были измерены при трех интенсивностях актиничного света: 3440, 4900 и 6230 мкЭ м⁻²с⁻¹. Предполагалось, что световые константы ($k_{\alpha\alpha}$, $k_{x\beta}$) изменяются пропорционально интенсивности актиничного света. Использование различных интенсивностей актиничного света позволило снизить неоднозначность в определении параметров модели, поскольку, при изменении только световых констант, и фиксированных остальных параметров, решения модели должны хорошо ложиться на все экспериментальные точки. Идентификация параметров модели для выявления эффекта токсикантов проводилась для двух наборов кривых: 1) кривые, измеренные до добавления CdSO₄ (50 мкМ) и через 5 часов после его действия; 2) кривые, измеренные до добавления K₂Cr₂O₇ (50 мкМ) и через 5 часов после его действия. Экспериментальные и модельные кривые показаны на рисунке 3.11. В результате аппроксимации экспериментальных кривых были найдены значения параметров, при которых модельные кривые наилучшим образом соответствуют экспериментам (табл. 3.2). Из таблицы 3.2 видно, что под воздействием токсикантов наблюдается увеличение F_{ot} ($F_{ot} = 1 - \phi_{P_0}$), что может быть связано со снижением эффективности ФСII, более выраженным для CdSO₄ по сравнению с K₂Cr₂O₇. Доля α -центров под воздействием ионов тяжелых металлов практически не изменилась. Световые константы реакционных центров также остались практически неизменными под действием токсикантов.

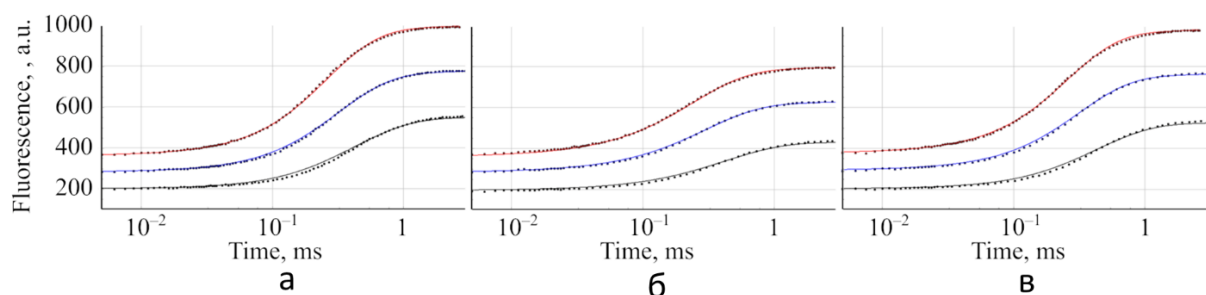


Рисунок 3.11 а – Экспериментальные кривые (точки) под воздействием токсикантов, измеренные в присутствии DCMU, и модельные кривые (линии): а – контрольные кривые до добавления CdSO_4 (50 мкМ); б – кривые, измеренные через 5 ч после добавления CdSO_4 (50 мкМ); в – кривые, измеренные через 5 ч после добавления $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (50 мкМ). Черные кривые соответствуют интенсивности актиничного света $3440 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$, синие кривые соответствуют интенсивности актиничного света $4900 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$, красные кривые соответствуют интенсивности актиничного света $6230 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$.

Действие токсикантов приводило к уменьшению доли активных КВК (s) причем для CdSO_4 (50 мкМ) эти эффекты проявлялись значительно сильнее даже через 5 часов воздействия, чем для $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (50 мкМ).

Таблица 3.2 – Параметры модели, полученные в результате аппроксимации экспериментальных кривых. Значения k_y , k_{xa} , $k_{x\beta}$ приведены для интенсивности измеряемого света $3440 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$.

Параметр	CdSO_4 , 50 мкМ		$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 50 мкМ	
	Контроль	Токсикант	Контроль	Токсикант
F_{ot}	0,36**	0,45**	0,36**	0,38**
K_{pred}	1,68*	1,68*	1,36*	1,36*
α	$0,68 \pm 0,04$	$0,63 \pm 0,05$	$0,61 \pm 0,04$	$0,66 \pm 0,04$
k_y	$13,97 \pm 1,28$	$13,97 \pm 1,28$	$12,88 \pm 0,89$	$12,88 \pm 0,89$
k_{xa}	$2,47 \pm 0,08$	$2,46 \pm 0,10$	$2,55 \pm 0,06$	$2,47 \pm 0,05$
$k_{x\beta}$	$0,44 \pm 0,27$	$0,44 \pm 0,27$	0,29*	0,29*
s	$0,91 \pm 0,05$	$0,31 \pm 0,04$	$0,84 \pm 0,04$	$0,66 \pm 0,03$

* – стандартное отклонение не определялось, ** – значение стандартного отклонения $\sigma < 0,01$

3.2.5. Комплексный анализ действия токсикантов с учетом всех использованных математических методов

Биологический ответ фотосинтетического аппарата на стрессовые факторы носит сложный динамический характер и включает несколько фаз – от начального повреждения до активации защитных механизмов, адаптации или окончательных повреждений. В отличие от традиционных подходов, основанных

на анализе конечных состояний или отдельных временных точек, непрерывный мониторинг позволяет идентифицировать последовательность происходящих изменений, оценить их скорость и определить пороговые уровни воздействия стресса. В рассмотренном исследовании был применен комплексный подход для изучения динамики реакции ФСII у *Chlorella vulgaris* при воздействии ионов тяжелых металлов, сочетающий биофизические методы – ежечасными измерениями флуоресценции хлорофилла *a* и спектров поглощения хлорофилла и каротиноидов, с математическими методами, такими как PCA, анализ параметров ЛР-теста и математическим моделированием. Набор биофизических методов позволил собрать большой массив данных, ~1800 параметров, характеризующий форму кривых индукции флуоресценции. Для первичного анализа этого набора данных был применен метод главных компонент (PCA), в результате чего были идентифицированы группы кривых со схожими характеристиками: 1) контроль и CdSO_4 (20 мкМ), 2) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (20 и 50 мкМ), 3) CdSO_4 (50 мкМ). Сформированные группы не соответствуют ожидаемому разделению на контроль, слабое и сильное воздействие токсикантов. Это указывает на то, что при низких концентрациях токсиканта механизм его влияния на организм может принципиально отличаться от такового при высоких дозах. Анализ динамики главных компонент помог выявить наиболее значимые особенности изменений формы кривых индукции флуоресценции, происходящих во время культивирования. Были выделены две основные закономерности: первая главная компонента (PCA_1) демонстрирует резкие сдвиги в начальный период после добавления токсикантов (за исключением CdSO_4 при 20 мкМ), после чего ее значения стабилизируются. Вторая компонента (PCA_2), напротив, демонстрирует постепенное и устойчивое увеличение на протяжении всего эксперимента. Таким образом, изменения в динамике главных компонент и параметров ЛР-теста при добавлении токсикантов наблюдаются на фоне изменений, указывающих на адаптацию культуры к росту в фотобиореакторе. Выявление этих двух различных динамических паттернов, связанных с PCA_1 и PCA_2 , подчеркивает основные

особенности динамики исходных параметров ЛР-теста. Поскольку динамика каждого параметра ЛР-теста одновременно отражает характеристики обеих главных компонент, хотя и в разной степени, визуальный анализ динамики всех параметров одновременно представляет собой сложную задачу. Сравнение с динамикой главных компонент значительно упрощает интерпретацию поведения параметров ЛР-теста, позволяя разделить их, по сути, на две группы: одна группа демонстрирует более выраженную корреляцию с динамикой $РСА_1$, в то время как другая коррелирует сильнее с $РСА_2$. Анализ того, какие именно параметры ЛР-теста группируются в соответствии с динамикой первой или второй главной компоненты, позволяет предположить, что динамика $РСА_1$ и связанных с ней параметров ЛР-теста в большей степени отражает изменения, происходящие внутри ФСII. Напротив, динамика $РСА_2$ и связанных с ней параметров ЛР-теста, по-видимому, связана с процессами, происходящими в ЭТЦ за пределами $РSII$, вероятно, в комплексе цитохрома $b6f$ или в $ФСI$. Помимо анализа параметров ЛР-теста, метод разностных кривых позволил выявить нюансы изменения формы индукционных кривых на начальном участке, характеризующие процессы на донорской стороне ФСII. В отличие от усредненных по всем характеристикам реакционных центров ФСII характеристик, полученных с использованием параметров ЛР-теста, математическая модель позволила выявить гетерогенность реакционных центров ФСII и оценить доли активных и неактивных реакционных центров, а также доли реакционных центров с полной антенной (α -центры) и центров, не имеющих периферийной антенны (β -центры). Таким образом, комплексный анализ набора данных позволил построить целостную картину динамических изменений в реакционных центрах ФСII в ответ на действие токсикантов $CdSO_4$ и $K_2Cr_2O_7$ в различных концентрациях.

Как видно из динамики спектральных характеристик, отражающих рост культуры и содержание пигментов (рис. 3.6), $CdSO_4$ и $K_2Cr_2O_7$ в концентрации 20 мкМ практически не влияют на рост культуры, тогда как под воздействием $K_2Cr_2O_7$ (50 мкМ) рост прекращается примерно через 10 часов после добавления токсиканта в культуру, а под воздействием $CdSO_4$ (50 мкМ) рост прекращается

примерно через 5 часов после его добавления (рис. 3.6 а). При низких концентрациях токсиканта содержание хлорофилла снижается лишь незначительно. В условиях высоких концентраций скорость синтеза хлорофилла резко падает (рис. 3.6 б). Однако в случае $K_2Cr_2O_7$ (50 мкМ) в дальнейшем росте культуры наблюдается небольшое увеличение содержания хлорофилла, что может указывать на попытки клеток адаптироваться к стрессу. В случае $CdSO_4$ (50 мкМ) содержание хлорофилла начинает снижаться уже примерно через 5 часов инкубации, что, вероятно, отражает необратимые повреждения, вызванные его более выраженным токсическим действием (рис. 3.6 б). Снижение содержания хлорофилла под воздействием $CdSO_4$ в концентрации 50 мкМ сопровождается относительным увеличением доли каротиноидов (рис. 3.6 в), что, вероятно, указывает на более быстрое снижение скорости синтеза хлорофилла по сравнению с каротиноидами. Одновременно наблюдается усиление нефотохимического тушения (снижение, рис. 3.6 г), что указывает на активацию механизмов рассеивания избыточной энергии. Сочетание этих изменений демонстрирует наиболее выраженный токсический эффект $CdSO_4$ (50 мкМ).

Влияние токсикантов на размер антенны не обнаружено; доли α - и β -центров практически не изменились (табл. 3.2). Однако при высоких концентрациях токсикантов наблюдается увеличение параметра ABS/RC, что обычно связано с увеличением эффективного поперечного сечения антенны. Это кажущееся противоречие можно объяснить тем, что под воздействием токсикантов увеличивается количество поврежденных реакционных центров (увеличение на рис. 3.6 г), и, соответственно, увеличивается общая площадь антенны на один реакционный центр. Этот эффект особенно выражен под воздействием $CdSO_4$ (50 мкМ) (рис. 3.9 д). Для $K_2Cr_2O_7$ при обеих концентрациях на ранних стадиях наблюдается аналогичное увеличение ABS/RC. Однако при концентрации 20 мкМ значение параметра начинает снижаться примерно через 10 часов, что может указывать на активацию механизмов адаптации клеток к стрессу. Анализ процессов на донорной стороне ФСII показывает, что $CdSO_4$ при

концентрации 20 мкМ практически не влияет на кинетику флуоресценции (рис. 3.10 б, ж). В то же время CdSO_4 (50 мкМ) и $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (50 мкМ) вызывают выраженное увеличение индукции флуоресценции в области К-фазы (рис. 3.10 в, д, з, к), что указывает на замедление реакций на донорной стороне ФСII. Результаты моделирования подтверждают, что это связано с инактивацией КВК: доля активного КВК снижается с 84 до 66% под воздействием $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (50 мкМ) и с 91 до 31% под действием CdSO_4 (50 мкМ) (табл. 3.2). При концентрации $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 20 мкМ наблюдается немонотонная динамика: первоначально отмечается увеличение интенсивности К-фазы, а примерно через 10 ч значения возвращаются к контрольному уровню (рис. 3.10 г, и), что снова может указывать на активацию механизмов адаптации клеток к стрессу. На акцепторной стороне ФСII эффект токсикантов менее выражен. Было зафиксировано небольшое увеличение параметра V_J , отражающего долю Q_B -невосстанавливающих центров, одинаковое для CdSO_4 (50 мкМ) и обеих концентраций $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (рис. 3.9 д). Также наблюдается уменьшение потока электронов, восстанавливающих конечные акцепторы на ФСI (RE_0/RC) (рис. 3.9 и). Однако в случае CdSO_4 (50 мкМ) примерно через 10 ч инкубации RE_0/RC начинает увеличиваться. Как и в случае с параметром ABS/RC , увеличение RE_0/RC , вероятно, связано с тем же механизмом: повреждением значительной части реакционных центров, приводящим к перераспределению потока электронов между оставшимися активными центрами.

Снижение эффективности ФСII под воздействием токсикантов (снижение PI_{ABS} на рис. 3.9 в) может быть связано с повреждением ее различных компонентов. Известно, что ионы кадмия вытесняют магний из хлорофилла и нарушают структуру белков реакционных центров. В свою очередь, ионы дихромата вызывают окислительное повреждение белков ФСII, включая индукцию активных форм кислорода, что также ухудшает их функциональное состояние [Hayat et al. 2012, Rodríguez et al. 2007]. Оба токсиканта влияют на перенос электронов, что проявляется в увеличении доли Q_B -невосстанавливающих центров, особенно при длительном воздействии. Это

может быть следствием дезорганизации мембран хлоропластов, вызванной перекисным окислением липидов или ингибированием ферментов, участвующих в их синтезе [Titov et al. 2011, Hayat et al. 2012]. Было отмечено, что эффект $K_2Cr_2O_7$ более выражен при более длительных временах, вероятно, из-за его способности непосредственно окислять липиды и усиливать образование активных форм кислорода (АФК) [Hayat et al. 2012]. Влияние Cd^{2+} на КВК может быть связано с вытеснением Ca^{2+} из марганцевого кластера, это препятствует связыванию воды и нарушает стабильность каталитического центра [Sigfridsson et al. 2004]. Предполагается, что Ca^{2+} участвует в образовании водородных связей, необходимых для окисления воды [Lovyagina, Semin 2016]. Cd^{2+} может нарушать процесс фотоактивации ФСII, связываясь вместо Ca^{2+} [Faller et al. 2005]. Кроме того, Cd^{2+} подавляет активность карбоангидразы – фермента, поддерживающего функцию КВК при изменении pH путем удаления протонов – за счет замещения Zn^{2+} , входящего в ее структуру [Sas et al. 2006].

Действие $K_2Cr_2O_7$ связано с увеличением образования АФК, что приводит к повреждению КВК, в том числе за счет окисления его внешних белков и высвобождения ионов марганца из кластера [Rodríguez et al. 2007, Gupta et al. 2020]. Увеличение уровня АФК под воздействием Cd^{2+} связано с ингибированием антиоксидантных систем [Huang et al. 2017].

На антенный комплекс в рассматриваемом исследовании токсиканты практически не оказывали влияния. Однако существуют исследования, описывающие разрушение антенных комплексов под воздействием Cd^{2+} , включая ингибирование синтеза хлорофилла и дезорганизацию тримеров ЛНСII [Fagioni et al. 2009, Parmar et al. 2013]. Возможно, в нашем случае эффект токсикантов на антенну не успел проявиться, поскольку образцы для оценки размера антенны (наличие или отсутствие периферической части) были взяты после первых 5 часов добавления токсиканта. Таким образом, основные изменения под воздействием $CdSO_4$ и $K_2Cr_2O_7$ затрагивают донорную сторону

ФСII, КВК и процессы переноса электронов, в то время как антенный комплекс остается относительно неповрежденным.

Таким образом, продемонстрировано применение комплекса математических методов, для изучения динамического ответа ФСII в клетках *Chlorella vulgaris* при воздействии солей кадмия и хрома (CdSO_4 и $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). На первом этапе с помощью методов уменьшения размерности выделялись группы данных, различия между которыми затем подтверждались на следующих этапах при помощи математической модели, ЛР-теста и разностных кривых. Было показано, что действие токсикантов вызывает снижение эффективности работы ФСII, рост доли QB-невосстанавливающих центров и ингибирование КВК, при этом действие токсикантов на антенные комплексы выявлено не было. Такой подход к анализу данных позволяет выявлять изменение состояний различных элементов ФСII, что делает его перспективным инструментом для анализа переходных режимов в процессе роста культуры под действием различных факторов стресса.

3.3. Сравнение переходных процессов в ФСII водорослей, выращенных в различных световых условиях

В разделе 3.3. на основе анализа массива индукционных кривых (ИК), полученных для пяти видов водорослей: *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Ankistrodesmus*, *Pleurochloris*, *Stichococcus*, выращенных при интенсивностях света: $I_1 = 8 \text{ Вт м}^{-2}$ и $I_2 = 16 \text{ Вт м}^{-2}$, исследуются переходные процессы в фотосинтетическом аппарате клеток в зависимости от световых условий роста. Для пяти упомянутых видов водорослей и для каждого условия роста были измерены кривые индукции флуоресценции при действии нескольких интенсивностей актиничного света ($1840 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$, 3440 мкЭ , $4900 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$, $6230 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$, $7500 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$), при обработке DCMU и без такой обработки, которые затем были проанализированы с помощью представленной в предыдущей главе модели (2.15) и параметров ЛР-теста и представления кривых в виде суммы экспоненциальных функций. На рисунке 3.12 приведены нормированные на F_o кривые, полученные при интенсивности действующего света $I=3440 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$, из сравнения которых

видно, что все водоросли по-разному реагируют на световые условия, при которых культуры выращивались.

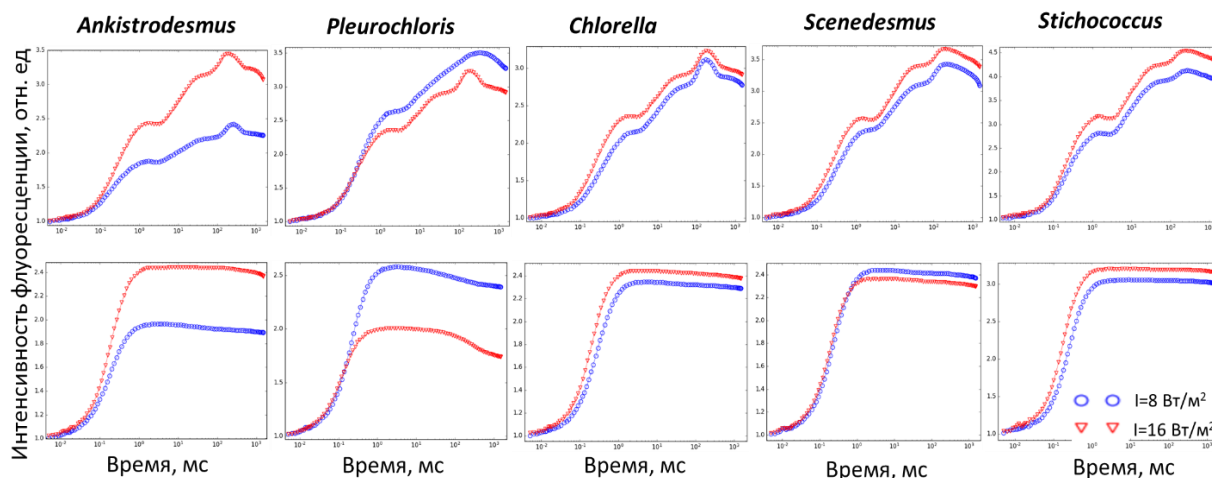


Рисунок 3.12 – Кривые индукции флуоресценции, нормированные на F_0 ; без обработки DCMU (верхний ряд); с обработкой DCMU (нижний ряд). Интенсивность действующего света $I = 3440 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$.

При анализе кривых с помощью модели предполагалось, что различия между альфа- и бета-центрами ограничиваются только эффективностью светосбора, и, как следствие, константами скоростей светозависимого образования возбужденных состояний пигмента реакционного центра в реакции $P \rightarrow P^*$ (соответственно, $k_{\alpha\alpha}$ и $k_{\alpha\beta}$), тогда как остальные константы скоростей всех реакций переноса электрона одинаковы. С помощью программы DBSolve [Gizatkulov et al. 2010] была проведена идентификация параметров этой модели для описанных выше наборов данных, каждый из которых включал несколько индукционных кривых, зарегистрированных для одной и той же пробы культуры микроводорослей при пяти различных интенсивностях действующего света. Для каждого набора данных, полученного для одной пробы, идентификация параметров модели проводилась одновременно по пяти экспериментальным кривым, зарегистрированным при разной интенсивности действующего света. Таким образом была обеспечена единственность наборов найденных параметров. Результаты аппроксимации приведены на рисунке 3.13.

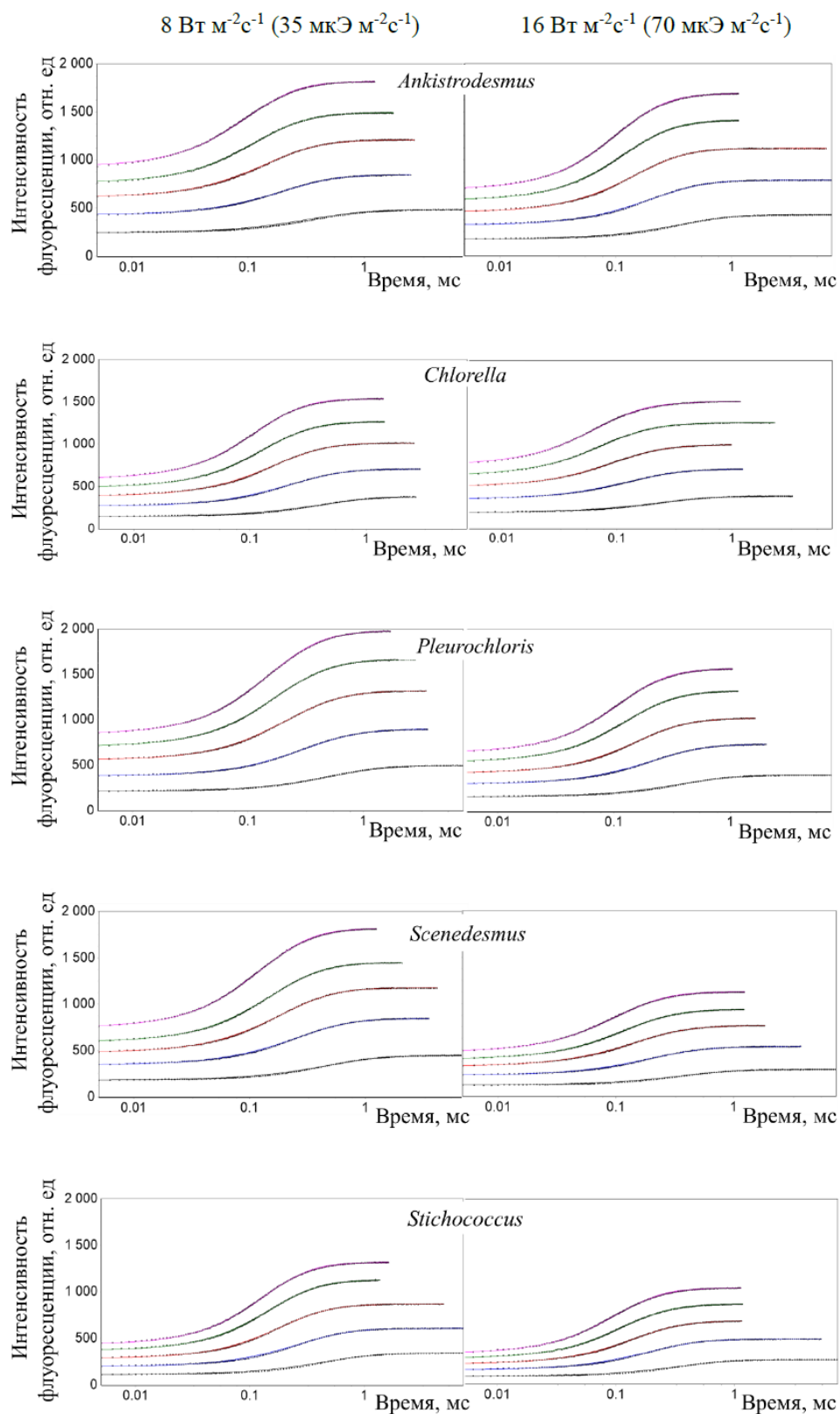


Рисунок 3.13 – Решения модели (линии), соответствующие экспериментальным кривым (точки) индукции флуоресценции, полученным при 5 интенсивностях действующего света. Расположение и цвет кривых снизу вверх соответствуют интенсивностям $I_1=1840 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$ (черная), $I_2=3440 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$ (синяя), $I_3=4900 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$ (красная), $I_4=6230 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$ (зеленая), $I_5=7500 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$ (лиловая).

Значения параметров, полученные в результате аппроксимации и параметры ЛР-теста, представлены в таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Параметры модели, полученные при аппроксимации экспериментальных кривых, и параметры ЛР-теста

	<i>Ankistrodesmus</i>		<i>Chlorella</i>		<i>Pleurochloris</i>		<i>Scenedesmus</i>		<i>Stichococcus</i>	
	I=8 Вт/м ²	I=16 Вт/м ²	I=8 Вт/м ²	I=16 Вт/м ²	I=8 Вт/м ²	I=16 Вт/м ²	I=8 Вт/м ²	I=16 Вт/м ²	I=8 Вт/м ²	I=16 Вт/м ²
$k_{\alpha}, \text{мс}^{-1}$	2.90±0.02	2.77±0.3	2.52±0.03	4.61±0.05	2.02±0.03	2.74±0.02	2.14±0.02	2.73±0.02	2.16±0.02	2.99±0.03
$k_{\beta}, \text{мс}^{-1}$	0.70±0.05		0.85±0.06		0.68±0.03		0.52±0.05		0.36±0.03	
α	0.72±0.01	0.74±0.01	0.77±0.01	0.65±0.01	0.57±0.01	0.70±0.01	0.71±0.01	0.73±0.02	0.74±0.01	0.66±0.02
s	0.26±0.01	0.93±0.04	0.85±0.03	0.25±0.01	0.79±0.02	0.78±0.02	0.58±0.02	0.40±0.02	0.83±0.03	0.76±0.03
$k_y, \text{мс}^{-1}$	41.03±1.29		35.25±1.07		28.23±0.66		33.58±1.43		32.12±0.93	
K_{pred}^{**}	1.52		1.46		1.83		1.88		1.17	
F_{ot}	0.35*	0.4*	0.36*	0.33*	0.39*	0.37*	0.34*	0.32*	0.3*	0.27*
V_j	0.63*	0.59*	0.65±0.01	0.81*	0.55*	0.62±0.02	0.57*	0.58*	0.58±0.02	0.60*
PI	0.15*	0.48*	0.47±0.03	0.05*	0.57±0.01	0.38±0.04	0.64±0.02	0.52*	0.66±0.11	0.65*
F_v/F_m	0.58*	0.71*	0.71*	0.59*	0.67*	0.69*	0.71*	0.73*	0.76*	0.78*

*Стандартная ошибка < 0.01

**Параметр K_{pred} был зафиксирован в ходе определения стандартных отклонений параметров, поскольку была обнаружена большая корреляция между ним и параметром k_y

Анализ формы кривых в пакете pyPhotoSyn с помощью мультиэкспоненциальной аппроксимации показал, что на всех кривых, полученных после добавления DCMU, можно выделить три в разной степени выраженные фазы (пример для *Chlorella* приведен на рисунке 3.14). Нарастание интенсивности флуоресценции содержит две фазы экспоненциального роста с разными характерными временами и разными амплитудами. Сигмоидность начального участка кривой, на котором интенсивность флуоресценции нарастает медленнее, чем по экспоненте, может быть связана с дополнительной экспоненциальной фазой с характерным временем порядка десятков микросекунд и отрицательной амплитудой.

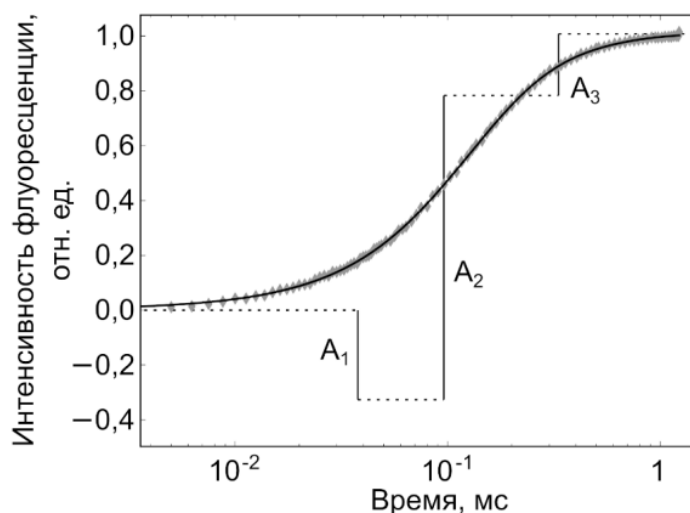


Рис. 3.14 – Разложение кривой индукции флуоресценции, полученной для *Chlorella*, выращенной при $8 \text{ Вт м}^{-2}\text{с}^{-1}$ ($35 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$), на три экспоненциальные фазы (сумма трех функций вида: $A_i (1 - \exp(-t/\tau_i))$): начальная фаза – отрицательная ($A_1 < 0$), и две положительные, основная, A_2 , соответствующая альфа-центрам, и дополнительная с меньшей амплитудой, A_3 , соответствующая бета-центрам.

Математическая модель позволила не только выделить на кривой экспоненциальные фазы, но и дать интерпретацию каждой из них. Более выраженная сигмоидность начальной фазы (фаза с амплитудой A_1) кривой в рамках модели отражает наличие большого числа активных КВК, сама фаза соответствует переносу электрона от КВК. Амплитуда этой фазы зависит как от доли активных КВК, так и от интенсивности действующего света при измерении индукционных кривых: она практически незаметна при низкой интенсивности света и растёт с её увеличением, а также с уменьшением доли неактивных КВК. Характерное время этой фазы не зависит от интенсивности действующего света. Вторая и третья фазы отвечают за рост интенсивности флуоресценции и связаны с реакционными центрами с различным размером светособирающей антенны. Фаза с амплитудой A_2 имеет более короткое характерное время и соответствует ФСПа, фаза с амплитудой A_3 – ФСПб. Характерные времена этих фаз соотносятся с размерами антенны альфа- и бета-центров, соответственно. Изменение формы начального участка характеризует изменение активности КВК, тогда как изменение соотношения амплитуд двух других фаз характеризует изменение в соотношении альфа- и бета-центров. Идентификация параметров модели по

экспериментальным точкам позволила оценить эти изменения количественно (табл. 3.3).

Нужно отметить, что в определенных условиях, например, при очень высоких интенсивностях действующего света, когда характерное время фазы, связанной с переносом электронов от КВК, становится больше характерного времени фазы, связанной с разделением зарядов в альфа-центрах, амплитуды всех трех фаз могут оказаться положительными. В этом случае связанную с КВК фазу можно ошибочно соотнести с еще одним типом реакционных центров ФСII. Чтобы избежать такой ошибки, необходимо проводить эксперименты при нескольких интенсивностях действующего света. Если фаза характеризует один из типов реакционных центров (ФСII α , ФСII β и ФСII γ), тогда характерное время этой фазы будет меняться обратно пропорционально интенсивности действующего света. Если же фаза характеризует перенос электронов от КВК, тогда ее характерное время не должно изменяться при изменении интенсивности действующего света.

Использование математической модели и параметров ЛР-теста позволило получить комплексную оценку гетерогенности реакционных центров ФСII для пяти различных видов водорослей, *Ankistrodesmus*, *Chlorella*, *Pleurochloris*, *Scenedesmus*, *Stichococcus*, каждая из которых выращивалась в двух разных световых условиях. Несмотря на то, что ФСII является довольно консервативным пигмент-белковым комплексом, гетерогенность ФСII проявляется как у всех видов водорослей, выращенных в одинаковых световых условиях, так и у одного вида водоросли, выращенного в разных световых условиях (табл. 3.3). Известно, что оптимальные значения освещенности для разных видов водорослей варьируют в широких пределах. В зависимости от предпочтений условий роста водоросли, как и высшие растения, можно разделить на светолюбивые и теневыносливые. Светолюбивые водоросли нуждаются в большом количестве света для нормального роста и фотосинтеза. Это, в основном, синезеленые и многие зеленые водоросли, которые обильно растут в летнее время в верхних слоях воды. Теневыносливые водоросли, напротив, приспособлены к условиям

низкой освещенности и избегают яркого света. Используемые для анализа в данной работе водоросли являются лабораторными культурами, содержащимися в одинаковых световых условиях. В естественных условиях эти виды водорослей могут входить в состав планктона прудов и озер. Предпочтение тех или иных световых условий при схожести фотосинтетического аппарата, возможно, определяется физиологией этих организмов, сложившейся в процессе эволюции.

Индексы PI (индекс производительность) и F_v/F_m (квантовый выход первичной фотохимии) показывают, что для *Ankistrodesmus* более предпочтителен высокий свет, для *Chlorella* – более низкий свет, тогда как остальные, *Pleurochloris*, *Scenedesmus*, *Stichococcus*, почти безразличны к световым условиям их культивирования. Эффективное сечение поглощения светособирающей антенны у альфа-центров, характеризуемое параметром модели k_x , у всех видов, кроме *Ankistrodesmus*, на более высоком свету роста увеличивается (у *Chlorella* значительней, чем у других), у *Ankistrodesmus* немного уменьшается. В целом это коррелирует с предпочтительностью в свете по параметрам PI и F_v/F_m . Изменение доли альфа- и бета-центров, α , также как и параметр k_x , отражает изменения в светосборе ФСII. Анализ изменения доли альфа- и бета-центров показывает, что у *Chlorella* и *Stichococcus* доля альфа-центров падает на 8-10% при росте на более высоком свету, тогда как у *Pleurochloris*, наоборот, возрастает, а у *Ankistrodesmus* и *Scenedesmus* практически не меняется. Можно предположить, что отмеченное ранее увеличение эффективного сечения светособирающей антенны при действии неблагоприятных факторов среды может быть связано с уменьшением доли бета-центров при снижении скорости роста культуры.

Изменения в акцепторной части характеризуются параметром V_j , (доля Q_B -невосстанавливающих центров). Анализ показывает, что наибольшее увеличение доли Q_B -невосстанавливающих центров на ~15% при росте на высоком свету характерно для *Chlorella*, менее значительное на ~7% для *Pleurochloris*, практически не меняется у *Scenedesmus* и *Stichococcus*, и немного падает на ~4%, у *Ankistrodesmus*. Видно, что изменение доли Q_B -невосстанавливающих центров,

как и эффективное сечение антенны, коррелирует с предпочтительностью световых условий роста по PI и F_v/F_m .

Изменения в показателях, связанных со светосбором, интуитивно ожидаемы. Несколько неожиданными оказались изменения активности кислород-выделяющего комплекса в зависимости от световых условий роста. Доля активных КВК (параметр s в модели) при росте на более высоком свете значительно меняется у *Chlorella* (уменьшается на ~60%) и у *Ankistrodesmus* (увеличивается на ~65%), менее значительно – у *Scenedesmus* и *Stichococcus*, и практически не меняется у *Pleurochloris*. Как указывалось выше, изменение активности КВК может быть связано со стадиями сборки или деградации РЦ ФСII [Terentyev et al. 2019, 2020] в процессе роста культуры. Увеличение интенсивности света ускоряет фотоповреждение РЦ. Синтез белков и, соответственно, процессы репарации поврежденных центров, как и рост культуры в целом, также ускоряются при увеличении интенсивности света до некоторого предела. В связи с этим, в зависимости от того, являются ли организмы светолюбивыми или теневыносливыми, при одинаковом изменении интенсивности света доля РЦ с неактивным КВК может у одних видов увеличиваться, а у других – уменьшаться. При изменении интенсивности света могут также включаться специфичные механизмы ответа на стресс. Так, в работе [Hamilton et al. 2014] обсуждается физиологическая роль цитохрома b_{559} , входящего в состав ФСII, в регуляции сборки или деградации РЦ и, в частности, марганцевого кластера КВК при разных интенсивностях света.

Суммируя в комплексе изменения всех показателей, можно предположить, что среди исследуемых водорослей наиболее чувствительными к свету при выращивании оказались *Ankistrodesmus* и *Chlorella*. Более высокий свет предпочтительней для *Ankistrodesmus* и менее высокий для *Chlorella*, при этом у *Ankistrodesmus* на менее благоприятном свете ухудшаются показатели только донорной части ФСII – активность кислород-выделяющего комплекса, тогда как у *Chlorella* ухудшаются показатели и донорной, и акцепторной частей, а также светособирающей антенны. В заключении анализа хотелось бы подчеркнуть, что

приведенные оценки не претендуют на окончательный вывод по работе фотосинтетического аппарата исследованных водорослей в различных световых условиях роста. Скорее это пример комплексного использования простой модели и ЛР-теста для возможности всестороннего анализа эффективности работы ФСII и ее отдельных частей в различных условиях роста.

3.4. Выводы по главе 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 α - и β -центров, размера светособирающей антенны и активности КВК у пяти видов водорослей, что свидетельствуют о существовании разных стратегий адаптации даже у таксономически близких видов.

Результаты главы 3 представлены в работах:

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. – no. 7. – pp. 254–268.
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.
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.
 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.
 5. Plyusnina T., Khruschev S., Degtereva N., Konyukhov I., Solovchenko A., Kouzmanova M., Goltsev V., Riznichenko G., Rubin A. Gradual changes in the photosynthetic apparatus triggered by nitrogen depletion during microalgae cultivation in photobioreactor. // Photosynthetica. – 2020. – vol. 58.– pp. 443–451.
 6. 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.

Глава 4. Модели переходных процессов в клетках *Chlamydomonas reinhardtii*, связанных с перестройкой метаболизма, в ответ на серное голодание

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.

4.1. Модель переходных процессов в клетках *Chlamydomonas* при серном голодании

В данном разделе представлена кинетическая модель, включающая несколько иерархических уровней: электрон-транспортные пути через ФСII и цепь хлородыхания, динамика протонов вблизи стромальной стороны тилакоидной мембраны. Анализ экспериментальных индукционных кривых (ИК) показал, что уже через 24 часа после начала стресса происходит изменение формы кривой, увеличивается F_0 , резко снижается F_v/F_m , появляются новые фазы, связанные с накоплением восстановленного пластохинона [Antal et al. 2003]. 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 членов в уравнения.

4.1.1. Пути переноса электронов на фотосинтетической мембране

Перенос электронов в первичных реакциях фотосинтеза является основным процессом, в котором происходит образование и запасание энергии света в виде макроэргических соединений и трансмембранного электрохимического потенциала. Нарушения в фотосинтетическом транспорте электронов, возникающие под действием факторов стресса, приводят к соответствующим нарушениям общего метаболизма в растительной клетке. На сегодняшний день известны различные альтернативные пути транспорта электронов в мембране хлоропластов [Cournac et al. 2000, Nixon, Rich 2007], которые могут активироваться в условиях стресса. Так, в хлоропластах растений помимо линейного переноса электронов от ФСII к ФСI, существует циклический транспорт электронов вокруг ФСI, позволяющий при нарушении линейного транспорта генерировать разность потенциалов на мембране хлоропласта и обеспечивать синтез АТФ, необходимый для клеточного метаболизма. Все больший интерес вызывает изучение такого альтернативного пути, как хлородыхание.

Термин хлородыхание был введен Benoun [Benoun 1982] для описания транспорта электронов в хлоропластах, сходного с дыхательным процессом в митохондриях. Характерным признаком протекания хлородыхания является восстановление в темноте пула пластохинонов восстановительными эквивалентами стромы [Cruz et al. 2011]. Хлородыхание связано с работой двух ферментов, обнаруженных в хлоропластах, – НАД-Н-дегидрогеназным комплексом [Martin 2009 et al., Peng 2011 et al.] и пластидной терминальной оксидазой (РТОХ) [Kuntz et al. 2004, Joët et al. 2002] (рис. 4.1). Электроны от НАД(Ф)-Н, образующегося в центральных катаболических путях гликолиза, пентозофосфатного шунта и цикла Кребса, переносятся на пластохинон (PQ), который в восстановленной форме пластохинола передает электроны посредством РТОХ на конечный акцептор – кислород. Хлородыхание является

дополнительным способом регулирования окислительно-восстановительного состояния пула PQ в хлоропластах и стимулируется в условиях высокого уровня восстановленности НАД(Ф)·Н и пула PQ [Алехина и др. 2005].

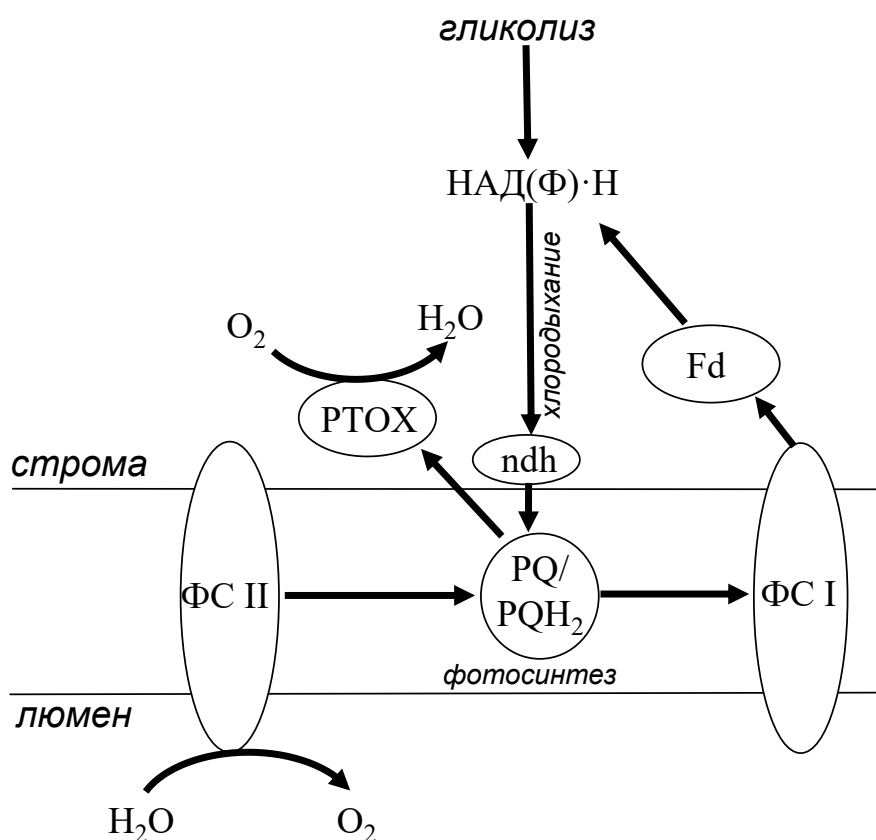


Рисунок 4.1 – Упрощенная схема организации электрон-транспортных цепей фотосинтеза и хлорордыхания на мембране тилакоида; ФС II – фотосистема II; ФС I – фотосистема I; ndh – НАД·Н-дегидрогеназа; PTOX – пластидная терминальная оксидаза; PQ/RQH₂ – пул пластохинонов. Стрелками показаны пути переноса электрона. Линейный перенос электронов в фотосинтезе осуществляется от ФС II до НАД(Ф)·Н через пул пластохинонов, ФС I и ферредоксин Fd. Хлорордыхание включает перенос электронов от окислительно-восстановительных эквивалентов НАД(Ф)·Н на терминальную оксидазу PTOX через пул пластохинонов.

Как показано в работах [Cruz et al. 2011, Antal et al. 2003, 2007, 2011], восстановленность пула PQ увеличивается при возникновении стрессовых условий, таких как серное голодание или при недостатке кислорода. Авторы связывают это с тем, что во всех случаях при стрессах, когда происходит нарушение дыхания вследствие разрушения ферментов дыхания или из-за недостатка кислорода, НАД(Ф)·Н перестает расходоваться на дыхание и начинает накапливаться в строме. При избытке НАД(Ф)·Н начинает происходить

восстановление пула PQ, активируется хлородыхание и снижается фотосинтетическая активность.

Для оценки фотосинтетической активности в условиях стресса анализируются кривые индукции флуоресценции как процесса, конкурирующего с фотохимическим переносом электронов в фотосистемах [Antal et al. 2003, 2007]. Как уже упоминалось в главе 1, в процессе освещения интенсивность флуоресценции может меняться от некоего исходного уровня F_0 (после темновой адаптации растения) до максимального уровня F_m (при насыщающей интенсивности света). Эти изменения в процессе индукции флуоресценции отражают этапы восстановления на свету первичного хинона Q_A . Максимальный уровень F_m соответствует полному восстановлению пула хинонов. В нормальных условиях освещения величина F_0 мала, что соответствует активному фотосинтезу, при котором не происходит задержки потока электронов в цепи фотосинтеза, и степень восстановленности пула PQ минимальна. Если после темновой адаптации происходит увеличение F_0 , то это говорит о восстановлении пула PQ в темноте и, тем самым, является признаком протекания хлородыхания.

Было показано, что при серном голодании [Antal et al. 2003, 2007, 2011], при повышенных температурах [Chemeris et al. 2004], в условиях недостатка влажности [Ibanez et al. 2010] и при недостатке кислорода [Cruz et al. 2011] минимальный уровень флуоресценции F_0 увеличивается. Это означает, что в условиях стресса в системе в темноте исходно накапливаются восстановленные формы хинона Q_A и, соответственно, способность ФСII к переносу электронов на свету и тушению электронного возбуждения снижается, т.е. происходит инактивация ФСII, причем поток электронов в цепи хлородыхания может в несколько раз увеличиваться [Chemeris et al. 2004].

В работах [Antal et al. 2003, 2011] было обнаружено, что в условиях серного голодания инактивация ФСII происходит скачкообразно, что указывает на существование триггерного механизма, управляющего переключением активного состояния в неактивное. При этом происходит увеличение F_0 , что указывает на увеличение восстановленных форм PQ в процессе усиления хлородыхания в

условиях стресса. Увеличение уровня F_0 может происходить за счет образования таких состояний фотосистемы, в которых нет переноса электрона с первичного хинона Q_A на пластохинон в Q_B -сайте.

Известно, что при освещении реакционных центров (РЦ) ФСII первой экспериментально обнаруживаемой радикальной парой является $P_{680}^+ - Pheo^{\bullet-}$. Следующим акцептором электронов является первичный хинон Q_A , который в нормальных условиях принимает и отдает один электрон. Если перенос электронов на Q_A заблокирован в результате интенсивного восстановления Q_A и накопления форм Q_A , или в результате удаления Q_A с места посадки, то при возбуждении РЦ образуются триплетные формы P_{680} . Ранее было установлено [Mieghem et al. 1989, 1995], что образованию триплетных форм может предшествовать образование дважды восстановленных форм хинона Q_A , которые, по мнению авторов, протонируются, образуя хинол Q_AH_2 . В работе [Gibasiewicz et al. 2001] делается аналогичный вывод о том, что восстановленный хинол может быть дважды протонирован, поскольку находится в нейтральной форме. Предполагается, что такие формы необходимы для восстановления фотосинтетической активности после фотоингибирования и служат своеобразным депо, позволяющим быстро активировать РЦ ФСII [Guenther, Melis 1990, Vass et al. 1992, Liu et al. 1993].

В обычных условиях фотосинтеза первичный хинон Q_A является одноэлектронным переносчиком, тогда как вторичный хинон Q_B (являющийся молекулой PQ, связанной с Q_B -сайтом) переносит два электрона. Однако в растворе молекулы обоих хинонов, имеющих одинаковое химическое строение и относящихся к классу убихинонов Q_{10} , способны к двухэлектронному восстановлению [Martin et al. 2011]. В составе ФСII каждый из хинонов по-разному связан с участками белка, связь хинона Q_A является несимметричной и более сильной [Martin et al. 2011]. Этим, по-видимому, обусловлена его “неподвижность” в РЦ и способность передавать только один электрон в обычных условиях. При определенных условиях связь Q_A с белком может

значительно ослабевать [Noguchi et al. 1999], следовательно, его способность к двухэлектронному восстановлению может увеличиваться.

Как указывалось выше, в условиях минерального голодания в темноте образуются восстановленные формы PQ и, как следствие, накапливаются восстановленные формы Q_A^- . Можно предположить, что в условиях стресса, при минеральном голодании, так же, как и при фотоингибировании, накопление Q_A^- может приводить к образованию дважды протонированных форм хинола (Q_AH_2). Поскольку образование дважды протонированных форм хинола является обратимой реакцией, это позволяет осуществить быструю реактивацию центров ФСII при возвращении к нормальным условиям.

Итак, регуляция транспорта электронов в хлоропластах в условиях стресса связана с накоплением восстановительных эквивалентов НАД(Ф)·Н в результате ингибирования митохондриального дыхания и активации гликолиза, увеличением уровня восстановленного пластохинона (PQH_2) и образованием дважды протонированных форм хинола Q_AH_2 . Существенной особенностью регуляции является то, что экспериментально наблюдаемая инактивация ФСII и соответственное увеличение минимального уровня флуоресценции F_0 может происходить “скачкообразно” за относительно короткие промежутки времени [Antal et al. 2003, 2011]. Такого рода “скачкообразное” переключение одного режима на другой, очевидно, обусловлено теми стадиями работы ФСII, которые в кинетическом отношении имеют существенную нелинейную природу.

4.1.2. Формулировка модели

Описание процессов переноса электронов в ФСII и изменения редокс-состояний хинонных акцепторов было сделано на основе известной схемы [Baake, Schloder 1992], которая была модифицирована включением состояния с пустым Q_B -сайтом, а также учетом дважды протонированной формы Q_AH_2 (рис. 4.2 а).

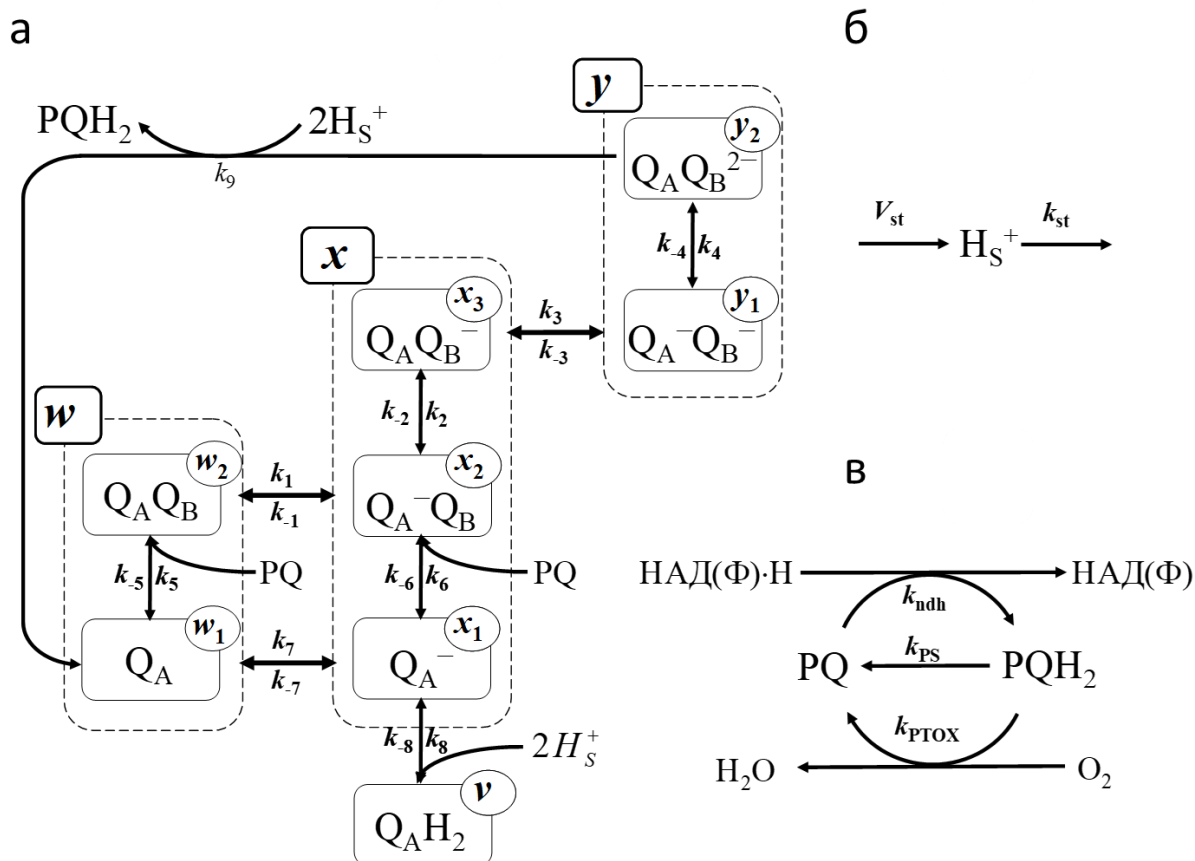


Рисунок 4.2 – Схемы переноса электронов при хлородыхании фотосинтезе:

а – кинетическая схема процессов переноса электронов между состояниями ФСII. Состояния комплекса определяются степенью восстановления хинонных акцепторов. В пунктирные прямоугольники объединены состояния с одинаковым количеством электронов; б – реакции транспорта протонов в строме вблизи тилакоидной мембраны. V_{st} – приток протонов из стромы к мембране тилакоида, k_{st} – отток протонов в строму; в – кинетическая схема окислительно-восстановительных реакций пластохинона в цепи хлородыхания и фотосинтеза. НАД·Н-дегидрогеназа в реакции k_{ndh} катализирует перенос электронов с НАД(Ф)·Н на PQ. Пластинная терминальная оксидаза, РТОХ, в реакции k_{ptox} катализирует перенос электронов с PQH_2 на кислород на стромальной стороне мембраны тилакоида. k_{ps} – реакция окисления PQ в цепи фотосинтеза.

Последовательность первичных процессов переноса электронов в РЦ ФСII представлена на рисунке 4.2 а. В условиях темновой адаптации все РЦ находятся в открытых нейтральных состояниях, Q_A (w_1) и $Q_A Q_B$ (w_2). Под действием света в реакциях k_1 и k_7 происходит возбуждение пигмента P_{680} , с последующим разделением зарядов и переносом электронов на первичный акцептор феофитин, и восстановление первичного хинона с образованием форм Q_A^- (x_1) и $Q_A^- Q_B$ (x_2). Обратный переход с константами k_{-1} и k_{-7} описывает флуоресценцию состояний Q_A^- (x_1) и $Q_A^- Q_B$ (x_2). Далее в реакции k_2 электрон переносится на вторичный хинон Q_B (молекула пластохинона, PQ, связанная с Q_B -сайтом), образуя форму

$Q_A Q_B^-$ (x_3), в которой первичный хинон Q_A вновь может восстанавливаться. Следующий квант света, поглощаемый в реакции k_3 , вызывает аналогичные стадиям k_1 и k_7 реакции с образованием формы $Q_A^- Q_B^-$ (y_1). Далее в реакции k_4 второй электрон переносится на вторичный хинон Q_B , образуя форму $Q_A Q_B^{2-}$ (y_2) с полностью восстановленным вторичным хиноном. Протонирование состояния $Q_A Q_B^{2-}$ (y_2) протонами стромы H_s^+ приводит к высвобождению молекулы восстановленного пластохинола PQH_2 из Q_B -сайта в реакции k_9 . Далее электроны с пула пластохинонов переносятся по цепи фотосинтеза к РЦ ФС I (реакция k_{PS} , рис. 4.2 в). Молекула PQ в реакциях k_5 и k_6 садится в пустой Q_B -сайт состояний Q_A (w_1) и Q_A^- (x_1), образуя соответственно формы $Q_A Q_B$ (w_2) и $Q_A^- Q_B$ (x_2). Присоединение двух протонов стромы H_s^+ к форме Q_A^- (x_1) в реакции k_8 приводит к образованию комплекса $Q_A H_2$ (v), который в дальнейших реакциях переноса электрона не участвует.

В реакциях (рис. 4.2б) учтены приток протонов H_s^+ из стромы к фотосинтетической мембране с постоянной скоростью V_{st} ($V_{st} = \text{const}$ за счет избытка протонов в строме относительно примембранной области) и пассивный отток в строму (реакция k_{st}).

При описании кинетики переноса электронов в цепи хлордыхания были рассмотрены две основные стадии: восстановление PQ электронами НАД(Ф)·Н в реакции, катализируемой дегидрогеназой ndh , и окисление пластохинона РТОХ с переносом электронов на кислород (рис. 4.2 в).

В соответствии с кинетическими схемами, представленными на рисунке 4.2, была записана система дифференциальных уравнений, которая затем была редуцирована с учетом квазиравновесных стадий и закона сохранения (см. Дополнительные материалы в работе [Supplement]):

$$dx/dt = q_1 - (q_{-1} + q_8[H_s^+]^2 + q_3 - q_1)x + (q_{-8} - q_1)v + (q_{-3} - q_1)y \quad (4.1)$$

$$dy/dt = q_3x - (q_{-3} + q_9[H_s^+]^2)y \quad (4.2)$$

$$dv/dt = q_8[H_s^+]^2x - q_{-8}v \quad (4.3)$$

$$d[H_s^+]/dt = V_{st} - k_{st}[H_s^+] - q_9[H_s^+]^2y - q_8[H_s^+]^2x + q_{-8}v \quad (4.4)$$

$$d[PQH_2]/dt = k_{ndh}NAD(P)H(1 - PQH_2) - (k_{PTOX}O_2 + k_{PS})PQH_2 + q_9[H_s^+]^2y \quad (4.5)$$

Здесь $x = x_1 + x_2 + x_3$ – сумма состояний ФСII ($Q_A^- + Q_A^-Q_B + Q_AQ_B^-$), в которых присутствует один электрон; $y = y_1 + y_2$ – сумма состояний ФСII с двумя электронами ($Q_A^-Q_B^- + Q_AQ_B^{2-}$); v – дважды протонированный первичный хинон, Q_AH_2 ; $[H_S^+]$ – концентрация протонов в строме вблизи мембраны; $[PQH_2]$ – концентрация восстановленного пластохинона; $NAD(P)H$ и O_2 – параметры, соответствующие концентрациям НАД(Ф)·Н и кислорода; q_i – эффективные константы скоростей, выраженные через сочетания констант скоростей исходной модели (см. Дополнительные материалы в работе [Supplement]).

Уравнения (4.1–4.3) описывают переходы между разными состояниями ФСII (рис. 4.2 а). Уравнение (4.4) описывает изменение концентрации протонов $[H_S^+]$ в строме вблизи фотосинтетической мембраны за счет обмена протонами стромы и примембранной области ($V_{st} - k_{st}[H_S^+]$), и их потребление в реакциях ФСII (реакции k_8 , k_{-8} , k_9 , рис. 4.2 б). Уравнение (4.5) описывает изменение концентрации восстановленного пластохинона PQH_2 за счет следующих процессов: восстановление молекулами НАД(Ф)·Н (реакция k_{ndh} , рис. 4.2 в) в хлородыхании, восстановление ФСII в фотосинтезе (реакция k_9 , рис. 4.2 а), окисление РТОХ в хлородыхании (реакция $k_{рТОХ}$, рис. 4.2 в) и окисление в цепи фотосинтеза (реакция k_{PS} , рис. 4.2 в).

4.1.3. Иерархия времен в модели

Сравнивая скорости изменения переменных редуцированной системы (4.1–4.5), были выделены три характерных масштаба времени: 1) 0.1–200 мс – время восстановления первичного хинона Q_A (в соответствии с экспериментальными кривыми индукции флуоресценции), характеризует диапазон времен фотосинтетических реакций, описываемых уравнениями (4.1–4.3); 2) 30–50 с – время установления стационарного значения рН в строме и люмене после освещения [Kuvykin et al.2011], характеризует временной диапазон изменения протонов, уравнение (4.4); 3) ~30 ч – время накопления и распада крахмала и белков при минеральном голодании [Zhang et al. 2002], может характеризовать скорость накопления молекул НАД(Ф)·Н, образующихся в этих

процессах, и, как следствие, скорость восстановления PQ в хлородыхании молекулами НАД(Ф)·Н, уравнение (4.5). Это позволило разделить переменные системы на быстрые – перенос электронов в ФСII (4.1–4.3), средние – изменение концентрации протонов в строме (4.4) и медленные – изменение концентрации PQ (4.5). Используя теорему Тихонова о квазистационарных состояниях, можно разделить систему уравнений (4.1–4.5) на три подсистемы: уравнения (4.1–4.3), (4.4) и (4.5), в соответствии с тремя масштабами времени, и рассматривать каждую подсистему отдельно.

Концентрация протонов $[H_S^+]$ входит в подсистему (4.1–4.3) как параметр, поскольку является медленно меняющейся переменной, относительно быстрых стадий переноса электронов в ФСII. Концентрация пластохинона $[PQ]$ входит в константы q_3 , q_{-1} и q_8 следующим образом:

$$\begin{aligned} q_3 &= k_1 K_2 K_6 [PQ] / \{1 + K_6 [PQ] (1 + K_2)\}, \\ q_{-1} &= k_{-1} (1 + K_6 [PQ]) / \{1 + K_6 [PQ] (1 + K_2)\}, \\ q_8 &= k_8 / \{1 + K_6 [PQ] (1 + K_2)\} \end{aligned}$$

(см. Дополнительные материалы 1). Учитывая, что уравнение (4.5) описывает процессы гораздо более медленные, чем уравнения (4.1–4.3), концентрацию $[PQ]$ в уравнениях (4.1–4.3) также можно считать параметром.

При рассмотрении реакций в секундном диапазоне времени в уравнении (4.4), стадии переноса электронов можно рассматривать как квази-стационарные по отношению к изменениям протонов в строме. Тогда, применяя теорему Тихонова и совершая предельный переход, система дифференциальных уравнений для быстрых переменных (4.1–4.3) может быть заменена на систему алгебраических уравнений. Окончательно было получено нелинейное дифференциальное уравнение, описывающее изменения концентрации протонов $[H_S^+]$ в строме вблизи тилакоидной мембраны:

$$d[H_S^+]/dt = g(H_S^+) - f(H_S^+), \quad (4.6)$$

где

$$\begin{aligned} g(H_S^+) &= V_{st} - k_{st}[H_S^+], \\ f(H_S^+) &= q_1 q_3 q_9 [H_S^+]^2 / \{q_1 q_9 K_8 [H_S^+]^4 + (q_1 q_{-3} K_8 + q_9 q_3 + q_9 q_{-1} + q_9 q_1) [H_S^+]^2 + q_3 q_1 + q_{-3} q_{-1} + q_{-3} q_1\}. \end{aligned}$$

Здесь $[H_S^+]$ – безразмерная концентрация протонов в строме вблизи мембраны, q_i – эффективные кинетические константы (см. Дополнительные материалы). Функция $g(H_S^+)$ отражает изменения концентрации протонов за счет пассивного обмена протонами между примембранным пространством вблизи тилакоида и объемом хлоропласта. Функция $f(H_S^+)$ в уравнениях отражает изменения концентрации протонов за счет протонирования первичного Q_A и вторичного Q_B хинонов, т.е. скорость перекачивания протонов ФС II из стромы в люмен. Нелинейность в виде полинома 4-й степени в знаменателе функции $f(H_S^+)$ возникает из-за присоединения двух протонов к каждому из хинонов.

Таким образом, разным временным диапазонам соответствуют следующие подсистемы. Уравнения (4.1–4.3) описывают быстрые процессы переноса электронов и восстановление хинонов в миллисекундном временном интервале, при этом концентрации протонов $[H_S^+]$ и пластохинона $[PQ]$ входят в уравнения как параметры. Уравнение (4.4) описывает изменение концентрации протонов $[H_S^+]$ в строме в промежутках времени, соответствующих интервалу десятков секунд, при этом концентрация пластохинона $[PQ]$ вновь является параметром, а состояния ФСII x , y , v являются квази-стационарными и определяются в соответствии с теоремой Тихонова, что позволило преобразовать уравнение (4.4) в уравнение (4.6).

4.1.4. Процессы, протекающие в миллисекундном временном диапазоне

Для определения параметров модели были использованы экспериментальные данные об индукции флуоресценции, полученные на клетках водоросли *C. reinhardtii* [Antal et al, 2007], выращенных в условиях голодания по сере (рис. 4.3).

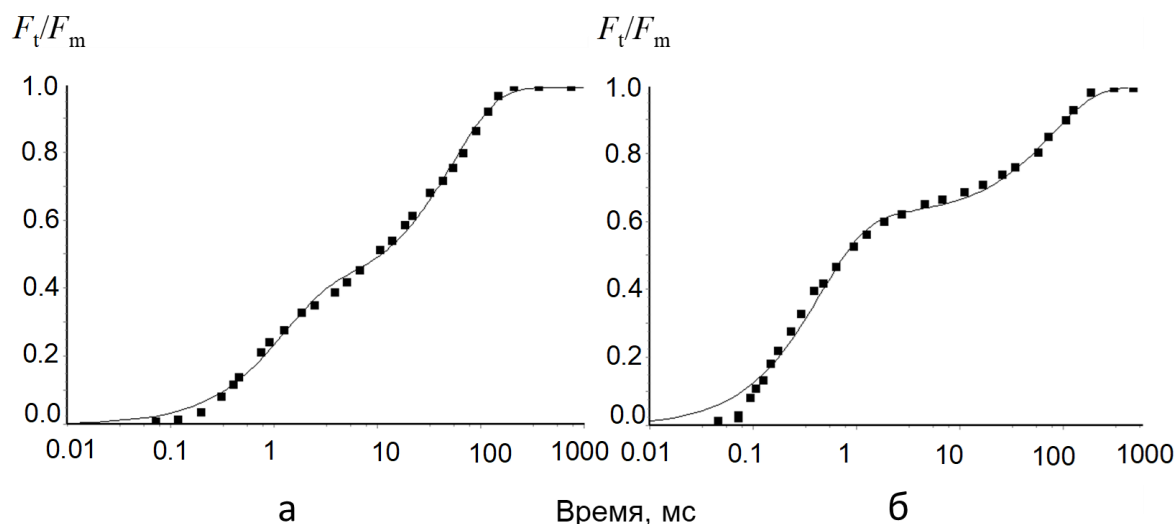


Рисунок 4.3 – Кинетические кривые световой индукции флуоресценции, измеренные на клетках *C. reinhardtii* и нормированные на максимальное значение: а – водоросли культивировали в оптимальных условиях. Параметры модели: $K_8 = 0.28$, $q_1 = 0.3$, $q_{-1} = 0.38$, $q_3 = 0.044$, $q_{-3} = 0.00002$, $q_9 = 0.00005$; б – растения инкубировали 48 ч на среде без серы. Точки – оцифрованные данные, соответствуют экспериментальным кривым, полученным в работе [Antal et al, 2007]; линии – модельные кривые. Параметры модели: $K_8 = 0.3$, $q_1 = 1.3$, $q_{-1} = 0.4$, $q_3 = 0.021$, $q_{-3} = 0.0001$, $q_9 = 0.00005$. $K_8 = q_8/q_{-8}$ – константа равновесия образования комплекса Q_AH_2 в редуцированной системе.

Экспериментальные данные на рисунке 4.3 аппроксимировались с помощью подсистемы (4.1–4.3), описывающей быстрые стадии переходов между состояниями ФСII. Флуоресценция F_t задавалась как сумма флуоресцирующих состояний исходной системы $x_1 + x_2 + y_1$, выраженных через новые переменные x и y (см. Дополнительные материалы 1):

$$F_t = x_1 + x_2 + y_1 = x (1 + K_6[PQ]) / \{1 + K_6[PQ](1 + K_2)\} + y K_4 / (1 + K_4).$$

Для сопоставления с экспериментальными данными флуоресценция F_t была нормирована на свое максимальное значение F_m .

В результате аппроксимации экспериментальных данных было определено два набора параметров. 1-й набор – для экспериментальной кривой, полученной в оптимальных условиях роста водоросли *C. reinhardtii* (рис. 4.3 а); 2-й набор – для экспериментальной кривой, полученной в условиях серного голодания (рис. 4.3 б).

4.1.5. Процессы, протекающие в секундном временном диапазоне

Переключение системы при серном голодании. Полученные при фитировании подсистемы (4.1–4.3) наборы параметров далее использовались в

подсистеме (4.6), описывающей изменения концентраций протонов $[H_S^+]$ в строме. В стационарном состоянии при значениях параметров из 1-го набора (оптимальные условия роста) график нелинейной функции $f(H_S^+)$, описывающей “перекачивание” ФС II протонов из стромы в люмен, имеет колоколообразный вид (рис. 4.4).

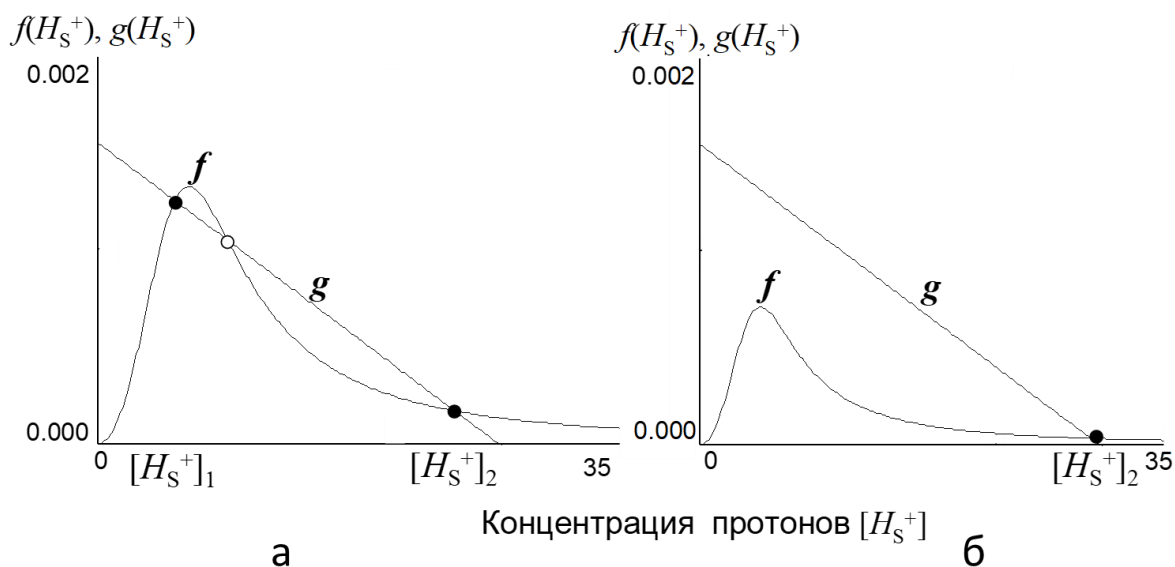


Рисунок 4.4 – Возможные стационарные решения подсистемы (4.6):

а – три стационарных состояния, $K_8 = 0.28$, $q_1 = 0.3$, $q_{-1} = 0.38$, $q_3 = 0.044$, $q_{-3} = 0.000002$, $q_9 = 0.000005$, $V_{st} = 0.0014$, $k_{st} = 0.000032$; б – при изменении параметров системы возможно переключение из состояния $[H_S^+]_1$ в состояние $[H_S^+]_2$, $K_8 = 0.3$, $q_1 = 1.3$, $q_{-1} = 0.4$, $q_3 = 0.021$, $q_{-3} = 0.0001$, $q_9 = 0.000005$, $V_{st} = 0.0014$, $k_{st} = 0.000032$. Черными кружками обозначены устойчивые состояния, белым кружком – неустойчивое.

При относительно небольшой концентрации протонов в строме (в обычных условиях активного фотосинтеза pH стромы = 8) скорость протонирования хинонов возрастает по мере увеличения концентрации протонов $[H_S^+]$ в строме – стадия нарастания кривой $f(H_S^+)$. Однако, когда концентрация протонов становится слишком большой, возникает эффект торможения, аналогичный известному эффекту субстратного ингибирования в ферментативной кинетике. В рассматриваемой системе аналогом концентрации субстрата служит концентрация протонов в строме $[H_S^+]$, а аналогом фермента – комплекс переносчиков ФСII. В терминах модели это соответствует накоплению неактивных форм Q_AH_2 и, как следствие, уменьшению числа переносчиков, участвующих в световых реакциях и уменьшению скорости перекачивания

протонов из стромы в люмен – стадия спада кривой $f(H_s^+)$. Этим и определяется наличие максимума на кривой $f(H_s^+)$ (рис. 4.4).

Прямая $g(H_s^+)$, описывающая обмен протонами со стромой, может пересекаться с колоколообразной кривой $f(H_s^+)$ в трех точках (рис. 4.4 а). то есть, в системе возможно существование трех стационарных состояний, два из которых устойчивы, $[H_s^+]_1$ и $[H_s^+]_2$, и одно неустойчиво, что и указывает на триггерные свойства системы.

Для иллюстрации механизма триггерного переключения можно рассмотреть следующий пример. Пусть система при значении параметров, соответствующих оптимальному росту (1-й набор), изначально находилась в состоянии $[H_s^+]_1$ (рис. 4.4 а), с более высокой скоростью перекачивания протонов ФСII из стромы в люмен и, следовательно, с более активным фотосинтезом. Чтобы описать условия серного голодания необходимо в выражении для $f(H_s^+)$ поменять, параметры 1-го набора, полученные при фитировании уравнений (4.1–4.3), на параметры 2-го набора. В результате этого функция $f(H_s^+)$ изменит свое положение (рис. 4.4 б) таким образом, что в системе останется только одно устойчивое состояние $[H_s^+]_2$, соответствующее более низкой скорости потребления протонов из стромы и, следовательно, менее активному состоянию ФСII. Это означает, что при значениях параметров, соответствующих условиям стресса, система самопроизвольно может переключиться в состояние с низкой активностью ФСII и с меньшим значением рН, соответствующим закислению стромы.

4.1.6. Ответ системы на изменение степени восстановленности PQ и скорости притока протонов в строму

В литературе описаны экспериментальные условия, в которых может происходить переключение между состояниями с высокой и низкой фотосинтетической активностью [Antal et al. 2003, 2011]. Указывается, что в условиях стресса снижается активность ФСII, увеличивается содержание восстановленных форм PQ за счет восстановительных эквивалентов НАД(Ф)·Н,

образующихся в процессе гликолиза, и, следовательно, концентрация окисленной формы PQ уменьшается. Таким образом, само по себе изменение соотношения окисленного и восстановленного PQ может являться регулирующим фактором в изменении активности фотосистем. В уравнении (4.6) концентрация окисленного пластохинона $[PQ]$ входит как параметр. Поскольку общее содержание всех форм PQ (PQ_t) является постоянным: $PQ_t = PQ + PQH_2$, то увеличение концентрации восстановленного пластохинона $[PQH_2]$ будет приводить к соответствующему уменьшению концентрации окисленной формы $[PQ]$. Как видно из рисунка 4.5 а, уменьшение параметра PQ будет приводить к последовательному изменению положения кривой $f(H_S^+)$ ($f_1 \rightarrow f_2 \rightarrow f_3$). В результате этого система (4.6), исходно находившаяся в состоянии $[H_S^+]_1$ с высокой активностью ФСII, переключается в состояние с низкой фотосинтетической активностью $[H_S^+]_2$ (рис. 4.5 а).

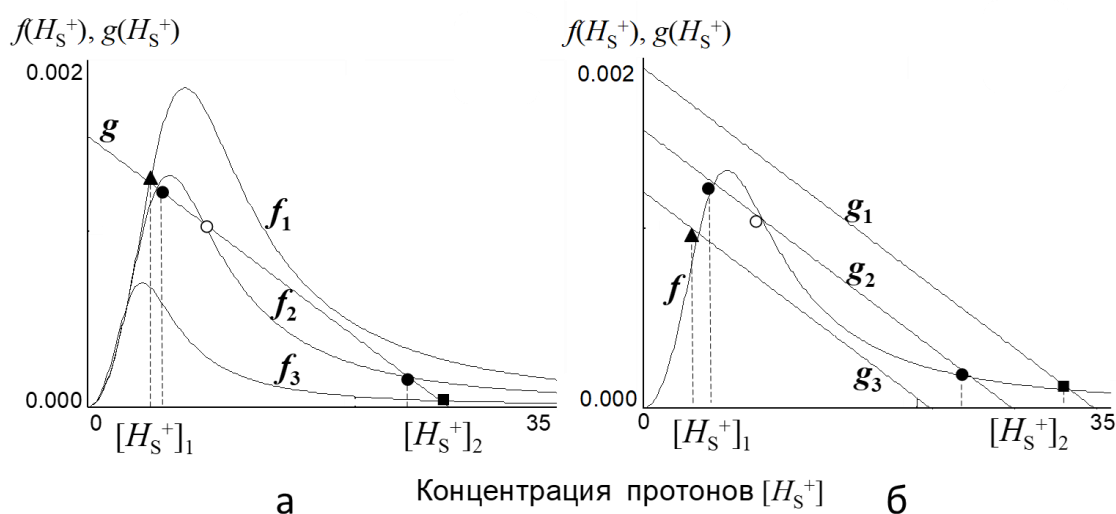


Рисунок 4.5 – Возможные стационарные решения подсистемы (4.6) в зависимости от изменения параметров: а – изменение числа стационарных состояний при изменении положения кривой $f(H_S^+)$ в зависимости от концентрации PQ; $V_{st} = 0.0014$; f_1 : $[PQ] = 1$, f_2 : $[PQ] = 0.75$, f_3 : $[PQ] = 0.5$; б – изменение числа стационарных состояний при изменении положения кривой $g(H_S^+)$ в зависимости от параметра V_{st} – скорости притока протонов из стромы; $[PQ] = 0.75$; g_1 : $V_{st} = 0.0011$, g_2 : $V_{st} = 0.0014$, g_3 : $V_{st} = 0.0017$.

Существуют данные [Tolstygina et al. 2009], что в условиях хлордыхания наблюдается закисление среды, что может коррелировать с уменьшением рН стромы (ее закислением). Это означает, что приток протонов из стромы будет расти, а величина соответствующего параметра V_{st} в модели будет увеличиваться.

Увеличение скорости притока V_{st} приведет к тому, что прямая $g(H_S^+)$ будет сдвигаться параллельно самой себе вверх, меняя свое положение относительно $f(H_S^+)$ (рис. 4.5 б, кривые $g_1 \rightarrow g_2 \rightarrow g_3$). В результате система вновь перейдет из состояния $[H_S^+]_1$ с высокой фотосинтетической активностью в состояние $[H_S^+]_2$ с низкой фотосинтетической активностью (рис. 4.5 б).

4.1.7. Процессы, протекающие в часовом временном диапазоне

Для наглядного представления кинетики триггерного перехода ФСII из состояния с высокой активностью в состояние с низкой активностью в условиях длительного серного голодания. уравнения (4.1–4.5) были рассмотрены совместно. Концентрация PQ является медленно меняющейся переменной, “включающей” быстрые триггерные изменения в концентрации протонов. Как видно из уравнения (4.5), в реакции хлородыхания увеличение концентрации восстановленного пластохинона $[PQH_2]$ определяется членом $k_{ndh} NAD(P)H$ (восстановление НАД(Ф)·Н-дегидрогеназой), а уменьшение – членом $k_{птох} O_2$ (окисление пластидной терминальной оксидазой), т.е. накопление PQH_2 будет происходить при увеличении концентрации НАД(Ф)·Н и уменьшении концентрации O_2 , что согласуется и с экспериментальными данными [Cruz et al. 2011, Antal et al, 2003, 2007, 2011]. Концентрации НАД(Ф)·Н и O_2 в данной модели являются параметрами, поэтому произведения $k_{ndh} NAD(P)H$ и $k_{птох} O_2$ также будут параметрами функции V_3 , которые подбирались в численном счете по экспериментальным данным [Antal et al, 2003].

На рисунке 4.6 приведена кинетика изменений переменных системы (4.1–4.5) при найденных параметрах: пластохинона PQH_2 , протонов стромы H_S^+ и скорости V_3 переноса электронов с Q_A на Q_B .

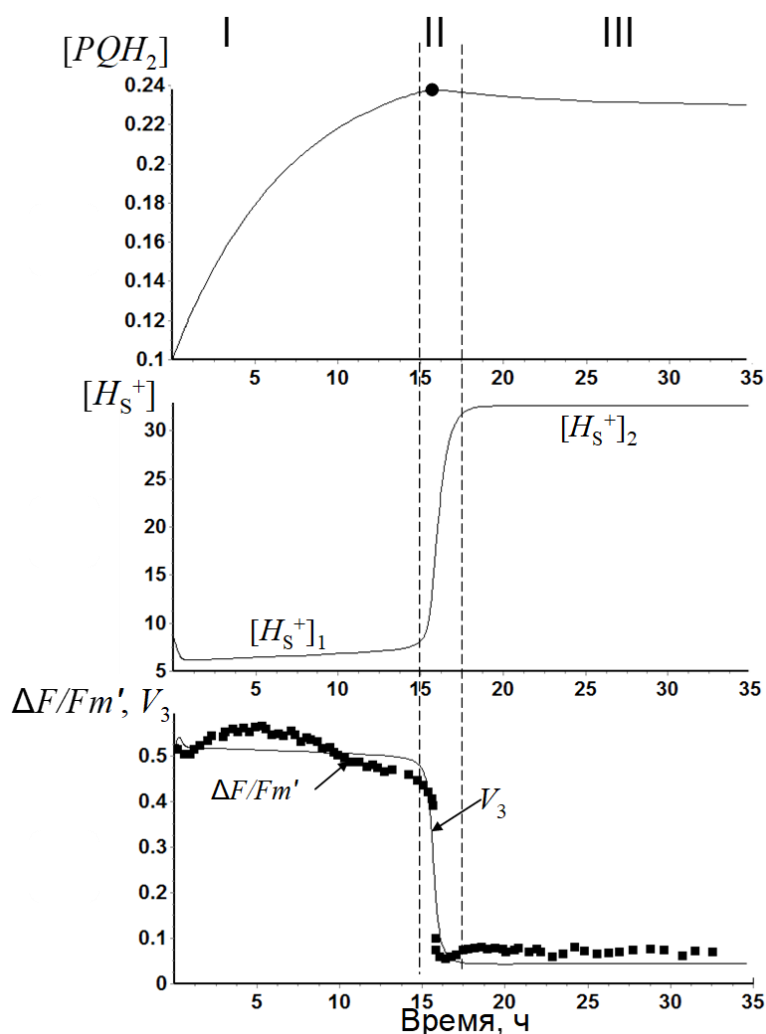


Рисунок 4.6 – Кинетика переключения системы (уравнения 4.1–4.5) между стационарными состояниями в процессе серного голодания: верхний график – изменение концентрации восстановленного пластохинона; средний график – изменение квазистационарной концентрации протонов в строме; нижний график – изменение квазистационарной скорости переноса электронов V_3 с Q_A на Q_B . Фазы I и III соответствуют медленным изменениям концентраций протонов H_s^+ и активности ФС I вблизи стационарных состояний. Фаза II соответствует скачкообразному переходу из одного стационарного состояния в другое. Точки – экспериментальные данные изменения активности ФСII, полученные в работе [Antal et al, 2003] для *C. reinhardtii* в условиях серного голодания. Линии – модельные кривые.

Можно выделить три фазы развития процессов. Фаза I – концентрация восстановленного пластохинона $[PQH_2]$ медленно, в течение примерно 15 ч, увеличивается (рис. 4.6 а) до достижения некой критической величины ($[PQH_2] \approx 0.24$). До этого момента ($t \approx 15$ ч) концентрация протонов $[H_s^+]$ (рис. 4.6 б) находится вблизи стационарного состояния $[H_s^+]_1$, соответствующего активному фотосинтезу (рис. 4.6 в). Фаза II – достижение значения PQH_2 критической

величины ($[PQH_2] \approx 0.24$) при росте культуры в условиях стресса является сигналом для триггерного увеличения концентрации протонов – переключение в состояние $[H_S^+]_2$ и скачкообразного уменьшения скорости переноса электронов, V_3 , которое происходит примерно за 10–20 минут (рис. 4.6 б, 4.6 в). Фаза III – система длительно, на протяжении десятков часов, находится в новом стационарном состоянии, соответствующем неактивной работе ФСII.

Результаты анализа модели электрон-транспортных цепей на мембране тилакоида позволяют предложить следующий механизм кинетической регуляции процессов у растений при наступлении стрессовых условий (рис. 4.7).

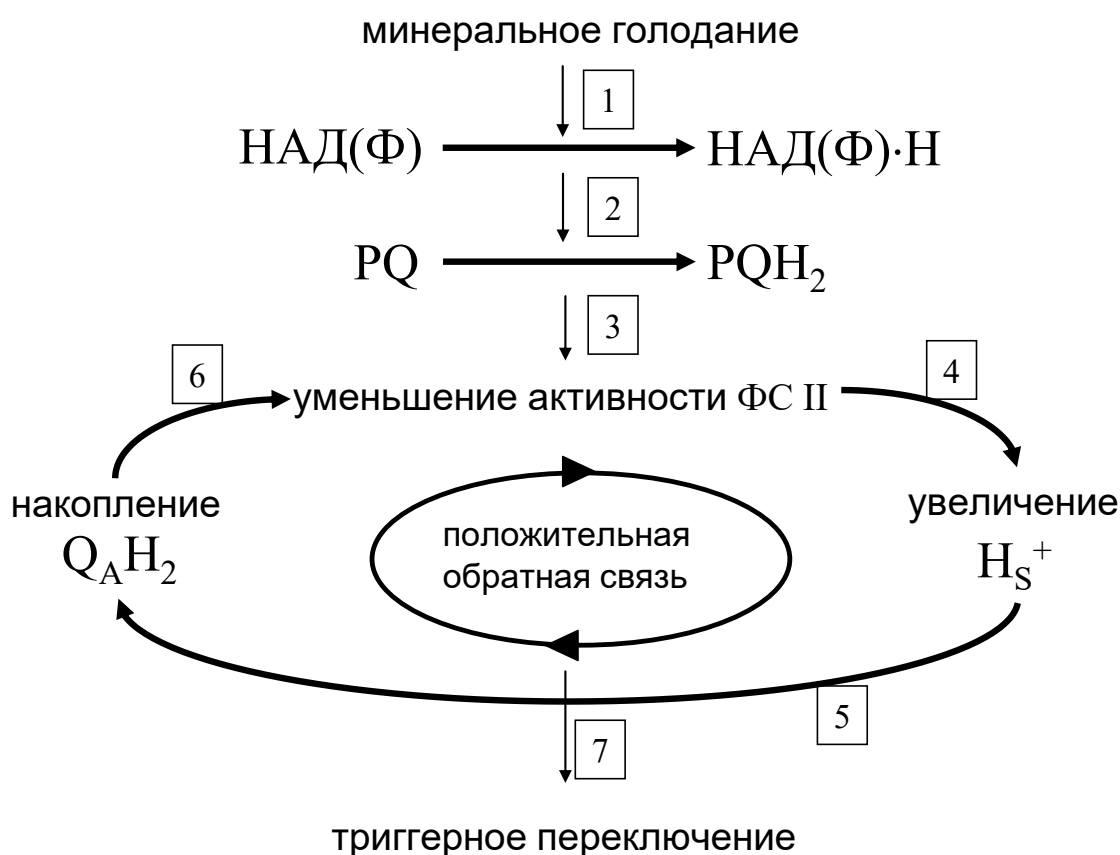


Рисунок 4.7 – Механизм регуляции процессов при наступлении стрессовых условий.

В обычных условиях на свету основной поток электронов в фотосинтетической цепи идет от РЦ ФСII на пул PQ и далее через цитохромный комплекс на ФСI. В этих условиях в клетках идет активный фотосинтез, в результате которого происходит запасание крахмала. Окислительно-восстановительные эквиваленты НАД(Ф)·Н тратятся на синтез крахмала и в митохондриальном дыхании. В

условиях стресса, в частности, при инкубировании клеток водоросли на среде с недостатком серы, наблюдается расщепление крахмала и переход в анаэробную стадию [Melis et al. 2000]. Расщепление крахмала происходит в центральных катаболических путях и сопровождается накоплением восстановленных форм НАД(Ф)·Н (рис. 4.7, стадия 1). Переход в анаэробную фазу сопровождается ингибированием дыхания, на которое НАД(Ф)·Н более не тратится, при этом уменьшается концентрация кислорода, что также приводит к накоплению восстановленных форм НАД(Ф)·Н. Накопление восстановленных форм НАД(Ф)·Н приводит к увеличению потока электронов от НАД(Ф)·Н на PQ. При этом меняется соотношение окисленных и восстановленных форм PQ – увеличивается доля восстановленного PQ и уменьшается доля окисленного PQ (рис. 4.7, стадия 2). Следствием является активация хлордыхания и инактивация ФСII (рис. 4.7, стадия 3), поскольку окисленного PQ, способного сесть в Q_B-сайт, становится меньше. Уменьшение активности ФСII приводит к уменьшению перекачивания протонов H_S⁺ из стромы, что приводит к их накоплению вблизи тилакоидной мембраны и закислению стромы (рис. 4.7, стадия 4). Избыток протонов в строме может приводить к образованию и накоплению дважды протонированной формы первичного хинона, Q_AH₂, что, возможно, соответствует описываемому в литературе накоплению Q_B-невосстанавливающих центров (рис. 4.7, стадия 5). В свою очередь, накопление дважды протонированных форм Q_AH₂ приводит к еще большей инактивации ФСII (рис. 4.7, стадия 6), поскольку первичный хинон Q_A в такой форме не способен участвовать в переносе электрона. Возникает петля положительной обратной связи, которая обуславливает лавинообразное изменение скоростей реакций, – происходит триггерное (скачкообразное) переключение в новый режим (рис. 4.7, стадия 7), в котором ФСII находится в неактивном состоянии.

Активация хлордыхания и восстановление пула PQ при неактивной ФС II позволяет ФСI функционировать в обычном режиме и защищает клетку от разрушения фотосинтетического аппарата.

4.2. Анализ распределения центральных метаболических потоков в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* в условиях серного голодания

Как указывалось в предыдущем разделе в настоящее время большое внимание привлекает проблема получения биотоплива, в частности, водорода, как продукта жизнедеятельности клеток водорослей. Экспериментальные и модельные исследования направлены на поиск условий, при которых происходит увеличение выделения водорода. Известно, что клетки водоросли *C.reinhardtii*, растущие в условиях серного голодания, активно выделяют водород [Wykoff et al. 1998, Melis et al. 2000, Ghirardi et al. 2000, Zhang et al. 2002]. Характерными процессами, предшествующими выделению водорода, являются инактивация фотосистемы II и переход клеток водоросли *C.reinhardtii* на хлоропластное дыхание [Antal et al. 2003, 2007, 2011]. В предыдущем разделе с использованием кинетической модели электронного транспорта в первичных процессах фотосинтеза [Плюснина и др. 2013], был проанализирован механизм таких переходов. Анализ модели показал, что накопление восстановленных форм хинонов в процессе голодания может приводить к скачкообразной инактивации фотосистемы II с одновременным увеличением потока электронов в цепи хлоропластного дыхания. Это явление было описано в экспериментах [Antal et al. 2003, 2007, 2011]. Выделение водорода в этих условиях происходит вследствие изменения направления электронных потоков при накоплении избыточных восстановленных форм переносчиков в цепи фотосинтеза [Antal et al. 2011, 2014, Peltier et al. 2010]. Оно осуществляется в целях защиты фотосинтетического аппарата от окислительного стресса при образовании активных форм кислорода.

Актуальной задачей является исследование распределения метаболических потоков в условиях стресса, вызванного серным голоданием. Очевидно, что полученная в результате анализа модели информация о величинах и направлениях скоростей метаболических реакций в процессе голодания важна для оценки эффективности выделения водорода и накопления биомассы в целом.

Для изучения направления и соотношения активности метаболических путей в различных условиях роста широко используются так называемые

потокосые или стехиометрические модели. Они построены на основе предположения о квазистационарном состоянии концентраций метаболитов в рассматриваемом диапазоне времени [Murabito et al. 2009, Varma et al. 1994, Edwards et al. 2002] и используют информацию о геноме организма и соответствующей структуре метаболитических путей, организованных в виде баз данных [<http://biocyc.org>, <http://www.brenda.uni-koeln.de>]. Переменными в таких моделях являются метаболитические потоки.

Одной из первых работ, где вводится понятие метаболитического потока, является работа [Roels, 1980], где живая система представлена как некий объем, имеющий границу. Все изменения в системе происходят 1) за счет транспортных потоков веществ (метаболитов) через границу и 2) за счет химических реакций в объеме. Метаболитический поток, таким образом, является результатом метаболитической реакции или группы метаболитических реакций. В современных обзорах, посвященных анализу распределения метаболитических потоков [Simeonidis, Price 2015, Nanette et al. 2009] величины потоков связаны с величинами отдельных скоростей реакций, в которых рассматриваемый метаболит образуется или расходуется.

Для большей ясности определим метаболитический поток как химическую реакцию, в которой может происходить перераспределение атомов, например, углерода, между образующимися в ходе реакции, молекулами, так что число атомов в молекуле субстрата может отличаться от числа атомов в молекулах продукта. При этом общее число атомов в закрытой системе остается постоянным. Такое перераспределение атомов в реакционном событии отражается в стехиометрических коэффициентах, определяющих относительное число молекул метаболитов, вступивших в реакционное событие на данном участке метаболитического пути, и число молекул метаболитов, образованных в ходе этого реакционного события при условии сохранения общего числа атомов, участвующих в реакции. Для каждого метаболита можно записать уравнение баланса потоков метаболитов, направленных на его образование и распад со стехиометрическими коэффициентами, отражающих сохранение числа

переносимых метаболитами элементов. В стационарном состоянии сумма всех потоков образования и распада рассматриваемого метаболита, равна нулю, поэтому для построения потоковой модели достаточно знать лишь стехиометрические соотношения между этими метаболическими потоками в реакционном событии.

Хорошо развитый аппарат линейной алгебры, применяемый для решения таких задач, позволяет строить модели со сколь угодно большим числом метаболических потоков. В зависимости от поставленной задачи потоковая модель может включать либо максимально известное число метаболических реакций, вплоть до нескольких сотен [Nanette, Morga 2009, Wu et al. 2015], либо ограничиваться небольшим числом реакций, непосредственно принадлежащих изучаемому метаболическому пути [Vallino, Stephanopoulos 1994, Yang et al 2002, Nyberg et al. 1999]. Для оценки реальных величин метаболических потоков часто используются экспериментальные данные о распределении в метаболитах переносимого ими меченого углерода ^{13}C [Marx et al. 1996, Zupke et al. 1995, Schmidt, et al. 1998]. Все реакции обычно нормируются на один из входящих потоков, например, приток глюкозы, переносящей углерод. Таким образом, изменяя именно этот входящий поток метаболита, можно получить серию последовательных стационарных распределений всех остальных потоков метаболитов, переносящих данный элемент, решая соответствующие уравнения баланса.

В задачу данного раздела работы входило построение потоковой модели, включающей центральный метаболизм клеток водоросли *C.reinhardtii* и сопряженные с ним реакции фотосинтеза и выделения водорода и анализ перераспределения этих метаболических потоков в процессе серного голодания. К реакциям центральных метаболических путей относят катаболические пути – гликолиз, пентозофосфатный путь, противоположно направленные к ним анаболические пути – глюконеогенез, цикл Кальвина, а также цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса).

Как правило, конкретные условия роста культуры определяют преимущественное направление метаболизма, которое может изменяться при изменении внешних условий. Такие изменения обуславливаются сложной регуляцией экспрессии соответствующих генов. Это приводит к изменению активности регуляторных ферментов и, как следствие, к переключению метаболических потоков, т.е. к изменению направлений переноса элементов метаболитами.

Как известно, в кинетических моделях метаболических процессов такую регуляцию можно задать, если ввести, например, положительные или отрицательные обратные связи между продуктами и/или субстратами, влияющими на скорости соответствующих реакций. Однако в потоковых моделях рассматриваются лишь стационарные состояния, а сами модели представляют собой линейные алгебраические уравнения, где скорости реакций являются постоянными величинами. Поэтому такого рода регуляцию на основе обратных связей здесь задать невозможно.

Возникает вопрос, каким образом в стационарной модели можно отразить изменение направления переноса углерода при переключении с одного типа метаболизма на другой, например, с гликолиза на глюконеогенез, или с цикла Кальвина на пентозофосфатный путь в ответ на изменение условий роста клеток. В работах [Covert et al. 2001, 2008] для описания такого рода регуляции метаболизма в потоковых моделях авторы используют логические правила по типу *if-then*, в соответствии с которыми считается, что в заданные периоды роста клетки часть реакций полностью «выключается» или «включается». Ясно, что такие правила справедливы лишь в предельных случаях, т.е. когда на самом деле реакция есть либо ее нет. Для реализации таких моделей требуются специальные программные средства.

Нами был предложен альтернативный способ отображения регуляции метаболических потоков, позволяющий описывать постепенное изменение направления потоков. В этом подходе объединяются метаболические пути, включающие одни и те же метаболиты, между которыми реакции могут

протекать в разных направлениях, например, гликолиз и глюконеогенез, и задаются дополнительные соотношения на входящие потоки, которые определяют условия «взаимодействия» потоков. Этот подход был использован для анализа распределения метаболических потоков в клетке водоросли *C.reinhardtii* в процессе роста в условиях серного голодания.

4.2.1. Упрощенные модели центральных метаболических путей

Для демонстрации предлагаемого подхода рассмотрим в качестве примера минимальную схему, отражающую изменения углеродного скелета метаболитов в центральных метаболических путях - гликолизе и глюконеогенезе (рис. 4.8).

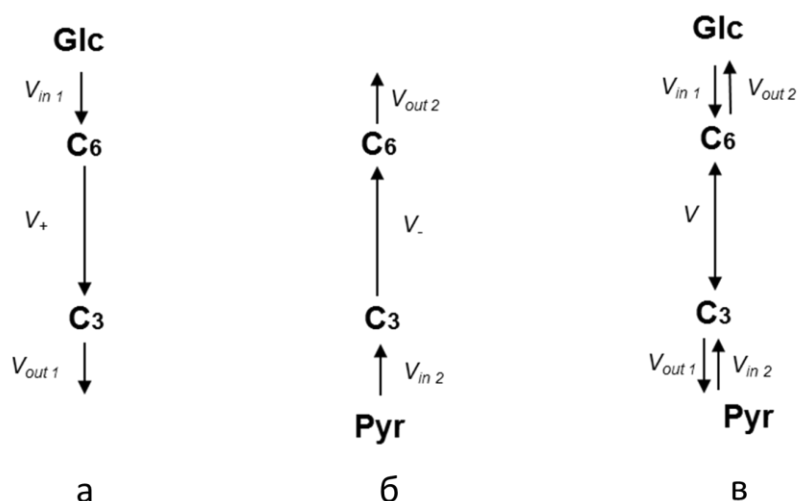


Рисунок 4.8 – Минимальные упрощенные схемы гликолиза и глюконеогенеза:
а – направление реакций соответствует гликолизу; б – направление реакций соответствует глюконеогенезу. в – объединение гликолиза и глюконеогенеза в одну схему.

Glc – глюкоза, C₆ – шестиуглеродный сахар, C₃ – трехуглеродный сахар, Pyr – пируват.

Стрелки соответствуют результирующим суммарным реакциям превращения метаболитов, V_i – соответствующий метаболический поток.

В процессе гликолиза (рис. 4.8 а) одна молекула глюкозы **Glc**, содержащая 6 атомов углерода, превращается в одну молекулу шестиуглеродного сахара **C₆** (реакция $V_{in\ 1}$), из которой затем образуются две молекулы трехуглеродного сахара **C₃** (реакция V_+), которые далее утилизируются в последующем метаболизме (реакция $V_{out\ 1}$). Обратный путь, глюконеогенез (рис. 4.8 б), представляет реакции превращения пирувата **Pyr** в трехуглеродные сахара, **C₃** (реакция $V_{in\ 2}$), и последующие реакции образования шестиуглеродных сахаров **C₆** (реакция V_-),

которые затем также утилизируются в метаболизме (реакция $V_{out\ 2}$). Назовем метаболиты, находящиеся в начале и конце метаболических путей, глюкозу **Glc** и пируват **Pyr**, внешними, а метаболиты, претерпевающие изменения внутри пути, **C₆** и **C₃**, – внутренними. Реакции, связывающие внешние и внутренние метаболиты, $V_{in\ 1,2}$ и $V_{out\ 1,2}$, соответственно, назовем внешними входящими и выходящими потоками, а реакции превращения внутренних метаболитов друг в друга V_+ и V_- – внутренними потоками. Объединим обе схемы в одну следующим образом (рис. 4.8 в). Будем рассматривать внешние потоки $V_{in\ 1,2}$ и $V_{out\ 1,2}$ как отдельные реакции, имеющие только одно направление в соответствии с направлением метаболического пути. Внутренний поток V будем теперь рассматривать как результирующую суммарную реакцию, способную протекать как в прямом, так и в обратном, направлениях.

Уравнения баланса для внутренних метаболитов **C₆** и **C₃**, в стационарном состоянии в соответствии со схемой (рис. 4.8. в) и с учетом стехиометрических коэффициентов (из одной молекулы **C₆** образуются две молекулы **C₃**) можно записать как:

$$\begin{aligned} \text{C}_6: V_{in\ 1} - V_{out\ 2} - V &= 0 \\ \text{C}_3: V_{in\ 2} - V_{out\ 1} + 2 \cdot V &= 0 \end{aligned} \quad (4.7)$$

Здесь V - относительное количество молекул углерода, переносимых метаболитами на данном участке цепи в стационарных условиях при сохранении общего числа атомов в системе.

Полученная система алгебраических уравнений (4.7) представляет собой простейшую потоковую (стехиометрическую) модель, где переменными являются метаболические потоки V_i . Система уравнений (4.7) является недоопределенной, поскольку число переменных в ней больше, чем число уравнений, поэтому система (4.7) имеет бесконечное число решений. Однако, распределение метаболических потоков (их величины и направление) в такой недоопределенной системе может быть найдено, если дополнительно поставить задачу оптимизации. Для этого нужно задать целевую функцию (как правило, это прирост биомассы либо увеличение продукции целевого метаболита), а также

ввести дополнительные ограничения на величины потоков, исходя из существующих экспериментальных данных [Murabito et al. 2009, Varma, Palsson 1994]. Другой способ получить единственное решение – доопределить систему, используя дополнительную информацию либо о величинах потоков, либо об их соотношениях. Именно этот подход будет использован в данной разделе.

Введем дополнительные соотношения между величинами входящих потоков в виде определенных правил. Они позволят, с одной стороны, описать переключения одного направления метаболизма на другое, а с другой стороны, дадут возможность доопределить систему уравнений (4.7), решить ее и найти распределение потоков в системе в зависимости от величины входящего потока.

Составим линейную комбинацию уравнений системы (4.7) так, чтобы исключить внутренние потоки и оставить только входящие и выходящие потоки. Для этого умножим первое уравнение в системе (4.7) на 2 и сложим со вторым. Переносим по разные стороны равенства входящие и выходящие потоки, получим:

$$2 \cdot V_{in\ 1} + V_{in\ 2} = V_{out\ 1} + 2 \cdot V_{out\ 2} \quad (4.8)$$

Уравнение (4.8) означает, что в стационарном состоянии сумма всех входящих потоков равна сумме всех выходящих потоков с учетом их стехиометрических коэффициентов. Будем предполагать, что в течение периода роста, сумма всех входящих потоков остается постоянной величиной. Сделанное предположение запишем в виде следующего соотношения:

$$2 \cdot V_{in\ 1} + V_{in\ 2} = const \quad (4.9)$$

Соотношение (4.9) определяет правило, согласно которому уменьшение в сумме одного из входящих потоков автоматически должно привести к увеличению другого.

Выберем для удобства расчетов $const = 2$ (величина константы может быть произвольной, поскольку в соответствии с уравнениями баланса все внутренние потоки будут рассчитываться как доли от входящих потоков).

$$2 \cdot V_{in\ 1} + V_{in\ 2} = 2 \quad (4.10)$$

Полученное равенство постулирует, что построение углеродного скелета метаболитов может осуществляться за счет любого из доступных источников

углерода, в данном примере – и за счет глюкозы, и за счет пирувата. В случае истощения одного из источников, будет происходить «переключение» на другой источник, обеспечивая таким образом постоянство суммарного выхода метаболитов. По отношению к направлению метаболических путей это означает, что будет происходить «переключение», например, с гликолиза на глюконеогенез.

Рассмотрим один из предельных случаев отсутствия какого-либо из источников углерода, например, пирувата, когда $V_{in\ 2} = 0$ и одновременно $V_{out\ 2} = 0$. В этом случае направление всех потоков будет совпадать с направлением гликолиза. Тогда из уравнения (4.8) получим еще одно дополнительное соотношение:

$$2 \cdot V_{in\ 1} = V_{out\ 1} \quad (4.11)$$

Таким образом, уравнения баланса (4.7) и дополнительные соотношения (4.10) и (4.11) позволяют получить однозначные распределение потоков в зависимости от величины одного из входящих потоков, например, $V_{in\ 1}$:

$$V = 2 \cdot V_{in\ 1} - 1,$$

$$V_{in\ 2} = -2 \cdot V_{in\ 1} + 2,$$

$$V_{out\ 1} = 2 \cdot V_{in\ 1},$$

$$V_{out\ 2} = 1 - V_{in\ 1}.$$

Задавая значения притока углерода от глюкозы $V_{in\ 1}$ от максимального до минимального, можно рассчитать, как при этом меняются и все остальные потоки (табл. 4.1).

Таблица 4.1 – Расчет величин потоков на схеме (рис.4.8) при заданном изменении значений входящего потока $V_{in\ 1}$.

$V_{in\ 1}$	V	$V_{in\ 2}$	$V_{out\ 1}$	$V_{out\ 2}$
1	1	0	2	0
0.75	0.5	0.5	1.5	0.25
0.5	0	1	1	0.5
0.25	-0.5	1.5	0.5	0.75
0	-1	2	0	1

Сопоставляя значения таблицы со схемой, получим наглядное представление возможных распределений потоков, в зависимости от величины $V_{in\ 1}$ (рис.4.9.).

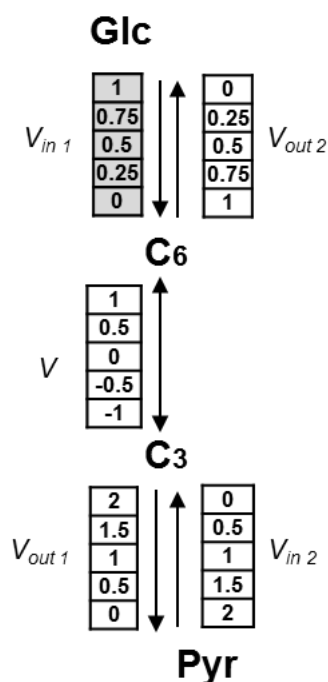


Рисунок 4.9 – Распределение потоков в зависимости от величины $V_{in\ 1}$. Серый столбик – заданные значения $V_{in\ 1}$, бесцветные столбики – рассчитанные величины соответствующих потоков. Номер ячейки соответствует каждому конкретному расчету.

Из расчетов видно, что уменьшение притока глюкозы $V_{in\ 1}$ от 1 до 0 сопровождается увеличением притока пирувата $V_{in\ 2}$ от 0 до 2, что и приводит к постепенному изменению направления внутреннего потока V , его величина меняется от 1 до -1, Иными словами при этом и происходит переключение гликолиза на глюконеогенез.

Рассмотрим еще один пример упрощенной схемы, позволяющий качественно описать некоторые экспериментальные данные. На рисунке 4.10 представлена минимальная схема, объединяющая гликолиз и цикл Кальвина.

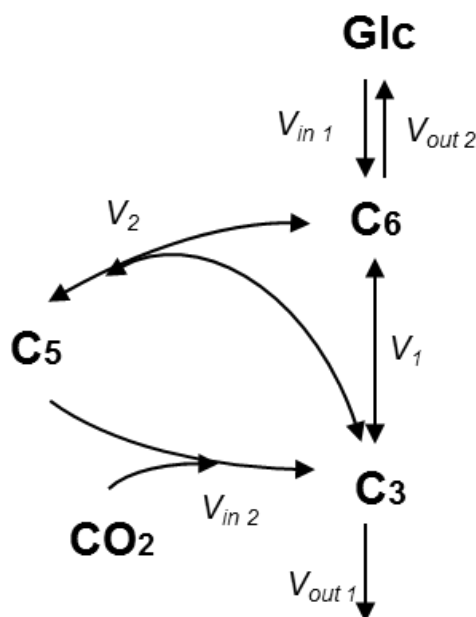


Рисунок 4.10 – Минимальная упрощенная схема, объединяющая гликолиз и цикл Кальвина. Glc – глюкоза, C₆ – шестиуглеродный сахар, C₅ – пятиуглеродный сахар, C₃ – трехуглеродный сахар.

Гликолиз представлен теми же реакциями, что и в предыдущем примере. Соответствующие входящий, внутренний и выходящий потоки на схеме: $V_{in\ 1}$, V_1 , $V_{out\ 1}$. Упрощенный цикл Кальвина включает реакцию фиксации CO₂ (реакция $V_{in\ 2}$), в которой происходит карбоксилирование пятиуглеродного сахара C₅. В результате образуются 2 молекулы трехуглеродного сахара C₃. Известно, что для образования 1 молекулы глюкозы требуется 6 молекул CO₂, тогда суммарно для реакции $V_{in\ 2}$ можно записать: $6\ C_5 + 6\ CO_2 = 12\ C_3$. Далее половина молекул C₃ в реакции V_1 идет на образование шестиуглеродного сахара C₆: $6\ C_3 = 3\ C_6$, другая половина молекул C₃ участвует в реакции V_2 и вновь возвращается в цикл. Кроме того, 2 из образовавшихся в реакции V_1 молекулы шестиуглеродного сахара C₆ также уходят в цикл в реакции V_2 : $6\ C_3 + 2\ C_6 = 6\ C_5$. Из оставшейся одной молекулы шестиуглеродного сахара C₆ в реакции $V_{out\ 2}$ образуется одна молекула глюкозы Glc: $C_6 = Glc$. Таким образом, представленный упрощенный цикл Кальвина сохраняет стехиометрические соотношения между реакциями полного цикла: для образования 1 молекулы глюкозы требуется 6 оборотов цикла Кальвина с общей фиксацией 6 молекул CO₂.

Выберем в качестве положительного направления для внутренних потоков направление против часовой стрелки. Уравнения баланса для

внутренних метаболитов с учетом стехиометрических коэффициентов будут иметь вид:

$$\begin{aligned} C_6: V_{in\ 1} - V_2 + V_1 - V_{out\ 2} &= 0 \\ C_3: 2 \cdot V_{in\ 2} - 2 \cdot V_1 - 3 \cdot V_2 - V_{out\ 1} &= 0 \\ C_5: 3 \cdot V_2 - V_{in\ 2} &= 0 \end{aligned} \quad (4.12)$$

Как и в предыдущем примере, составим линейную комбинацию так, чтобы исключить внутренние потоки – умножим первое уравнение на 6, второе – на 3, третье – на 5 и, складывая их, получим равенство сумм входящих и выходящих потоков:

$$6 \cdot V_{in\ 1} + V_{in\ 2} = 6 \cdot V_{out\ 2} + 3 \cdot V_{out\ 1} \quad (4.13)$$

Вновь будем предполагать, что сумма всех входящих потоков является постоянной величиной, взятой в этом примере для удобства равной 6.

$$6 \cdot V_{in\ 1} + V_{in\ 2} = 6 \quad (4.14)$$

Рассматривая один из предельных случаев, когда один из путей, например, гликолиз, не работает, $V_{in\ 1} = 0$, $V_{out\ 1} = 0$, получим еще одно дополнительное соотношение:

$$V_{in\ 2} = 6 \cdot V_{out\ 2} \quad (4.15)$$

Таким образом, уравнения баланса (4.12) и дополнительные соотношения (4.14) и (4.15) вновь позволяют выразить все потоки через один входящий поток, например, $V_{in\ 2}$:

$$\begin{aligned} V_1 &= 2/3 \cdot V_{in\ 2} - 1, \\ V_2 &= 1/3 \cdot V_{in\ 2}, \\ V_{in\ 1} &= -1/6 \cdot V_{in\ 2} + 1, \\ V_{out\ 1} &= -1/3 \cdot V_{in\ 2} + 2, \\ V_{out\ 2} &= 1/6 \cdot V_{in\ 2}. \end{aligned}$$

Задавая изменение $V_{in\ 2}$, получим возможные распределения остальных потоков (рис. 4.11 а). Будем считать, что каждое значение $V_{in\ 2}$ соответствует некоему моменту времени, в частности, значение в верхней ячейке – нулевому, а все, находящиеся ниже, получены через равные интервалы времени. Тогда ряд величин, полученный для каждого потока, будет отражать динамику изменения

этого потока. Интегрирование такого ряда по времени позволяет оценить изменение концентрации метаболита во времени за счет соответствующего потока.

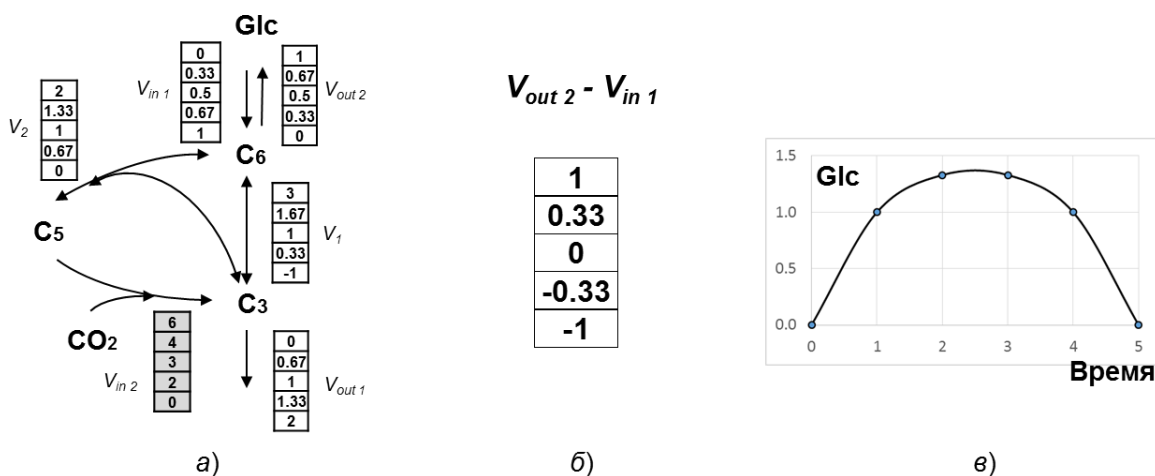


Рисунок 4.11 – Результат моделирования минимальной упрощенной объединенной схемы цикла Кальвина и гликолиза в зависимости от изменения величины $V_{in\ 2}$; а – значения потоков; серый столбик – заданные значения, бесцветные столбики – результаты расчета; б – расчет изменения скорости накопления глюкозы (крахмала) ($V_{out\ 2} - V_{in\ 1}$) в зависимости от инактивации Рубиско (изменения $V_{in\ 2}$); в – накопление и расход глюкозы (крахмала) с течением времени при инактивации Рубиско.

Расчет потоков позволяет оценить скорость накопления глюкозы и, соответственно, крахмала как разность двух потоков: $V_{out\ 2} - V_{in\ 1}$ (рис. 4.11 б.). Интегрируя скорость накопления глюкозы (крахмала), получим изменение концентрации глюкозы (крахмала) (рис. 4.11 в.). Из расчетов видно, что в процессе уменьшения фиксации CO₂, поток, направленный на образование крахмала сначала положителен, однако его величина уменьшается, затем становится отрицательной. То есть, по мере инактивации цикла Кальвина, крахмал сначала накапливается, затем начинает расходоваться, при этом происходит постепенное переключение цикла Кальвина на гликолиз. Качественно подобные процессы – накопление и расход крахмала при инактивации Рубиско, катализирующего фиксацию CO₂, соответствуют экспериментальным данным, полученным при серном голодании на клетках водоросли *C.reihardtii* [Zhang et al. 2002]. Это позволяет считать, что сделанные в модели предположения о соотношении входных потоков, действительно

отражают феноменологию переходных процессов и могут использоваться в качестве дополнительных уравнений в потоковых (стехиометрических) моделях.

4.2.2. Модель центральных метаболических путей с учетом электронтранспортных путей фотосинтеза и дыхания

Далее рассмотренный подход был применен для построения более детальной потоковой модели, включающей не только центральные метаболические пути в клетках *C.reinhardtii*, но и электронтранспортные пути фотосинтеза и дыхания (рис. 4.12). Как и в рассмотренных выше примерах, противоположно направленные пути были объединены в одну схему. Центральные метаболические пути схемы включают гликолиз, пентозофосфатный, глюкогenez, цикл Кальвина, цикл Кребса (рис. 4.12). Путь гликолиза представлен на схеме реакциями превращения глюкозы, Glc, в трехуглеродные сахара, GAP, 3PG, (реакции V_{3-5} , $V_{13,14}$), путь глюкогenezа – обратными реакциями синтеза шестиуглеродных сахаров, F6P, Glc, из трехуглеродных. Пентозофосфатный путь и цикл Кальвина представлены реакциями трансформации углеродного скелета в пятиуглеродные сахара, Ru5P, X5P, R5P, четырехуглеродный, E4P, и семиуглеродный, S7P, сахара (реакции V_1 , V_{6-11} , V_{13}). Разделение путей на гликолиз и пентозофосфатный путь (или на цикл Кальвина и глюконеогenez) достаточно условно, поскольку часть реакций входит в оба пути. Реакция V_{11} объединяет 2 реакции окислительного декарбоксилирования молекул глюкозо-6-фосфат с выделением 2-х молекул NADPH, присутствует только в пентозофосфатном пути и является необратимой. Реакция V_1 объединяет реакции образования рибулезодифосфата и фиксации CO_2 , характерна только для цикла Кальвина и также является необратимой.

Электронтранспортные пути включают восстановление пластохинона и NAD(P)H электронами от молекул воды в первичных реакциях фотосинтеза, обратный перенос электронов от NAD(P)H на пластохинон и молекулы воды в реакциях хлоропластного дыхания, а также реакции митохондриального дыхания.

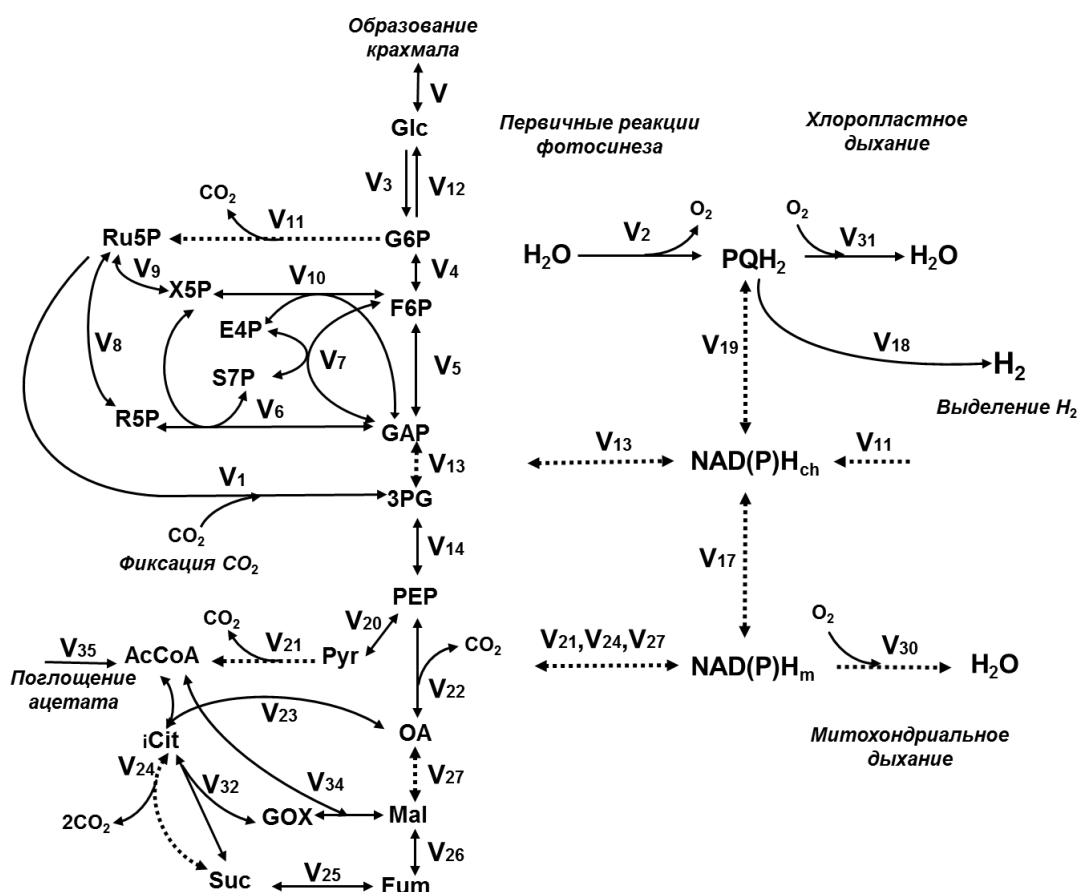


Рисунок 4.12 – Схема центральных метаболических путей, пути фотосинтеза, дыхания и образования водорода. Glc – глюкоза, G6P – Глюкозо-6-фосфат, F6P – фруктозо-6-фосфат, GAP – глицеральдегид-3-фосфат, 3PG – 3-фосфоглицерат, Ru5P – рибулозо-5-фосфат, X5P – ксилулозо-5-фосфат, R5P – рибозо-5-фосфат, E4P – эритрозо-4-фосфат, S7P – седугептулозо-7-фосфат, PEP – фосфоенол пируват, Pyr – пируват, AcCoA – ацетил коэнзим А, iCit – изоцитрат, GOX – глиоксилат, Suc – сукцинат, Mal – малат, Fum – фумарат, OA – оксалоацетат, NAD(P)H – никотинамидадениндинуклеотид(фосфат) восстановленный (индексы *ch* и *m* указывают на расположение молекул в хлоропластах или в митохондриях соответственно), PQH₂ – пластохинон восстановленный, CO₂ – углекислый газ, H₂ – водород, O₂ – кислород, H₂O – вода. V_i – реакции превращения одних метаболитов в другие (метаболические потоки). Пунктирные стрелки обозначают реакции, в которых происходит восстановление или окисление молекул NAD(P) и NAD(P)H. Односторонние стрелки указывают на протекание реакции только в одном направлении.

Первичные процессы фотосинтеза представлены потоками электронов V₂ от молекул воды к пластохинону через ФСII и далее на NAD(P)H через FSI и ферредоксин, реакция V₁₉. Связь центральных метаболических путей и фотосинтетического пути осуществляется посредством NADH-дегидрогеназы (реакция V₁₉, протекающая в направлении, противоположном вышеописанному), катализирующей восстановление пластохинона в реакциях хлорордыхания, которые активизируются в условиях серного голодания. Хлорордыхание включает реакции восстановления пластохинона электронами от NADH-дегидрогеназы

V_{19} , и окисление пластидной терминальной оксидазой с поглощением кислорода, V_{31} . Учтена также реакция образования водорода Fe-гидрогеназой, V_{18} , которая активируется в бескислородной среде, когда становится невозможным окисление пластохинона.

Митохондриальное дыхание обобщенно представлено реакциями переноса электронов на кислород от молекул NAD(P)H (реакция V_{30}), образованными в цикле Кребса в суммарном потоке $V_{21}+V_{24}+V_{27}$.

На основе предложенной схемы (рис. 4.12) по аналогии с уравнениями (4.7) и (4.12) были записаны уравнения баланса с учетом стехиометрии реакций. Поскольку для клеток *C.reinhardtii* питательной средой является ацетат, то построение углеродного скелета возможно тремя путями: в результате поглощение ацетата в цикле Кребса, в результате фиксации CO_2 в цикле Кальвина, в результате расщепления глюкозы в процессе гликолиза. Таким образом, схема имеет три входных потока: V_1 – фиксация CO_2 в цикле Кальвина, V_3 – поступление глюкозы, начальная реакция в гликолизе, V_{35} – поступление ацетата. Как и в рассмотренных выше примерах, выбиралась такая линейная комбинация уравнений баланса, чтобы остались только внешние потоки, и далее предполагалось, что сумма всех входящих потоков является постоянной величиной. Сделанное предположение выражается в виде следующего соотношения:

$$2V_1+3V_{35}+12V_3=12 \quad (4.16)$$

Соотношение (4.16) задает взаимодействие трех путей: цикла Кальвина, гликолиза и глюконеогенеза. Два входящих потока, V_1 и V_{35} , направлены на синтез сахаров, поток V_3 направлен на распад сахаров. Таким образом, из соотношения (4.16) следует, что уменьшение потоков на синтез сахаров приведет к увеличению потоков на их распад.

При учете одно из предельных случаев, когда работает только один из трех путей, например, цикл Кальвина, было получено еще одно дополнительное соотношение, связывающее внешние потоки цикла Кальвина:

$$12V_3 = 2V_{11}+3V_{21} \quad (4.17)$$

В качестве начального условия (контроль, 0 ч. голодания) были выбраны величины потоков, соответствующие миксотрофному росту клеток *C.reinhardtii* на ацетате. Расщепления глюкозы нет, $V_3 = 0$, при этом скорости поглощения ацетата, V_{35} , и фиксации CO_2 , V_1 , примерно равны, что с учетом стехиометрических соотношений (4.16) выражается как $2V_1=3V_{35}=6$. В соответствии с основным уравнением фотосинтеза поток на восстановление пластохинона, V_2 , должен быть в два раза больше, чем скорость фиксации CO_2 , V_1 , т.е. $V_2=2V_1=6$. Скорости хлоропластного дыхания, V_{31} , и выделения водорода, V_{18} равны нулю: $V_{31} = 0$, $V_{18} = 0$.

Окончательная система уравнений, описывающая распределение метаболических потоков в центральных метаболических путях, включает уравнения баланса для метаболитов, дополнительные соотношения между потоками и начальное условие. Такая система уравнений имеет единственное решение, соответствующее распределению метаболических потоков при выбранных начальных условиях.

Для того чтобы сопоставить результаты моделирования с реальными процессами, происходящими в клетках *Chlamidomonas reinhardtii* в условиях серного голодания, необходимы данные об изменении величин метаболических потоков в центральных метаболических путях в процессе серного голодания. Известные нам работы по исследованию метаболических процессов в клетках водоросли при наступлении серного голодания таких данных не содержат. Однако, существующие экспериментальные данные о содержании метаболитов, данные об изменении активности ферментов, позволяют оценить относительные величины внешних потоков в модели, если принять некоторые допущения. Так, в работе [Zhang et al. 2002] приведены данные об изменении активностей ФСII, Рубиско, Fe-гидрогеназы, а также о содержании кислорода в культуре, накоплении крахмала и выделении водорода в течение нескольких дней роста культуры клеток *Chlamidomonas reinhardtii* в условиях серного голодания. Активность ФСII в работе [Zhang et al. 2002] оценивалась по отношению F_v/F_m – квантовому выходу первичных реакций фотосинтеза. Было сделано

предположение, что скорость восстановления пула пластохинонов электронами от ФСII (в модели поток V_2 , рис. 4.12) пропорциональна изменению F_v/F_m . Тогда, данные об уменьшении активности ФСII по дням в процессе серного голодания позволяют рассчитать соответствующее уменьшение потока V_2 , по отношению к его начальной величине в первый день голодания. Содержание Рубиско в [Zhang et al. 2002] определялось с помощью Вестерн-блот анализа. Поскольку Рубиско является ферментом, катализирующим реакцию фиксации CO_2 (в модели поток V_1 , рис. 4.12), и, принимая во внимание, что в стандартные уравнения скоростей реакций по типу Михаэлиса-Ментен концентрации ферментов входят линейно, было сделано предположение, что изменение скорости фиксации CO_2 , V_1 , будет пропорционально изменению содержания Рубиско. Аналогично рассуждения были применены к оценке данных об изменении активности Fe-гидрогеназы, фермента, катализирующего образование водорода (в модели поток V_{18} рис. 4.12). Данные о накоплении крахмала в процессе голодания [Zhang et al. 2002] были соотнесены со стационарной скоростью образования крахмала (в модели поток V , рис. 4.12). Для оценки средней скорости рассчитывалась разность концентрации крахмала из двух последовательных измерений, которая затем делилась на соответствующий интервал времени. Данные по изменению содержания кислорода в культуре клеток в работе [Zhang et al. 2002] были соотнесены со стационарной скоростью поглощения кислорода в результате дыхания (в модели поток V_{30} , рис. 4.12).

Таким образом, были получены ряды численных значений для пяти внешних потоков модели: V , V_1 , V_2 , V_{18} , V_{30} , отражающие их изменение в течение 4 суток роста клеток *Chlamidomonas reinhardtii* в условиях серного голодания (табл. 4.2).

Таблица 4.2 – Нормированные экспериментальные данные из [Zhang, 2002] и соответствующие им потоки модели.

Время голодания (ч.)	Фиксация CO_2 , V_1	Активность фотосистемы II, V_2	Выделение водорода, V_{18}	Накопление крахмала, V	Поглощение кислорода, V_{30}
0	3	6	0	1.0	1
24	0.7	3.5	0.3	0.3	0.5
48	0.1	1.7	1	0	0.1
72	0	1	0.9	-0.1	0.1

Построенная схема центральных метаболических потоков (рис. 4.12) и соответствующая ей система уравнений [Плюснина и др. 2017], а также преобразованные экспериментальные данные (табл. 4.2) далее были использованы для анализа распределения метаболических потоков, изменения их величин и направлений, в течение 4 суток роста клеток *C.reinhardtii* в условиях голодания по сере (рис. 4.13).

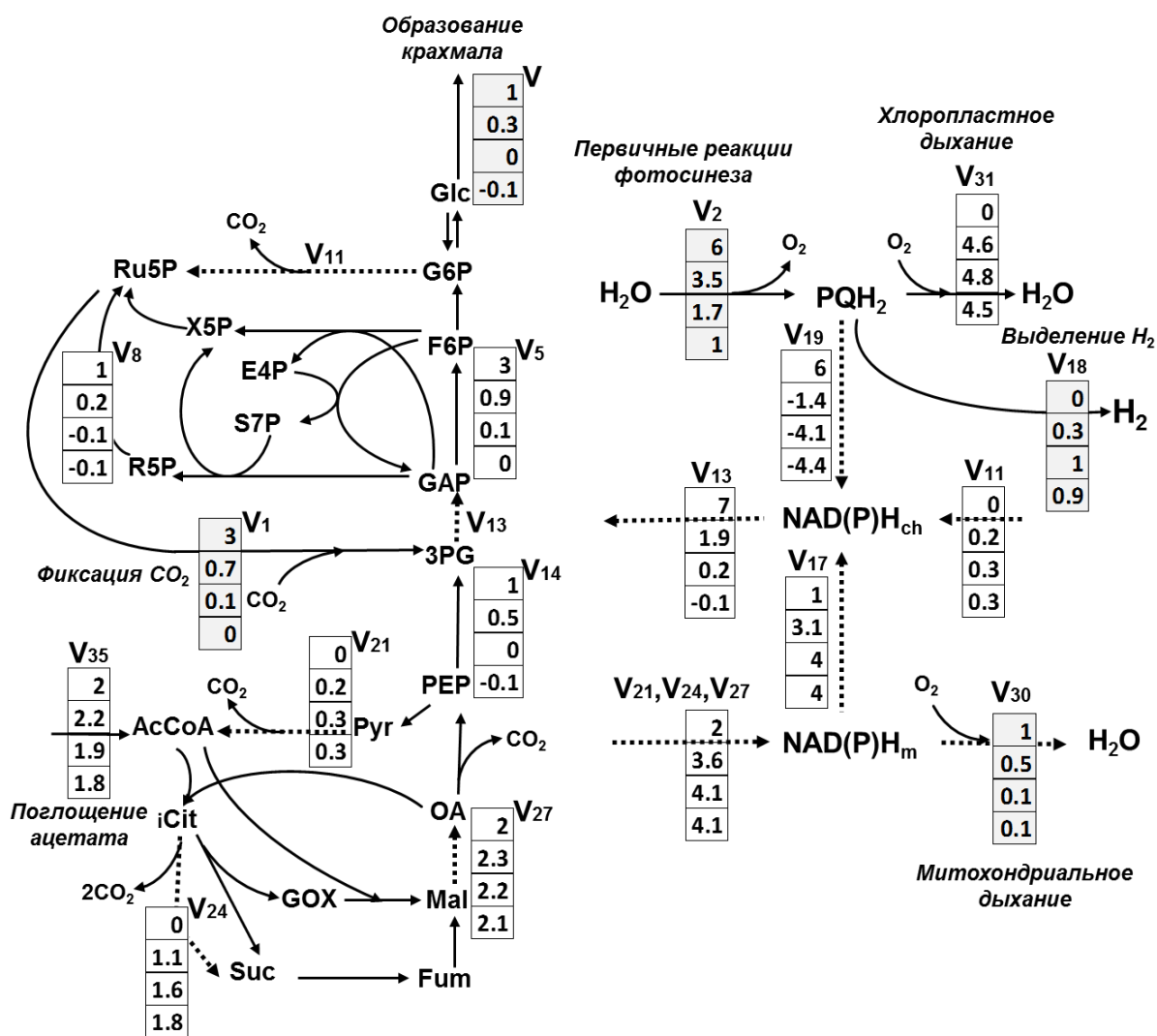


Рисунок 4.13 – Распределение метаболических потоков в течение 4 суток серного голодания. В столбиках указаны величины соответствующих метаболических потоков. Верхняя цифра в столбике соответствует началу голодания, нижеследующие цифры внутри столбика – значениям потоков через каждые 24 часа в течение 96 часов. Серые столбики – экспериментальные значения из таблицы 1, бесцветные столбики – результаты модельного расчета. Положительные величины указывают на совпадение направление потока с направлением стрелки, отрицательные величины обозначают направление потока, противоположное направлению стрелки.

Для каждого дня голодания было найдено распределение метаболических потоков, характеризующее соответствующую стадию голодания. Рассчитанные

изменения величин и направлений некоторых потоков в процессе 4 дней голодания, представлены на рисунке 4.13.

Найденные распределения потоков показывают, что в первые 24 часа голодания (верхняя строчка в столбиках с величинами потоков) активно работает цикл Кальвина ($V_1=3$), метаболический поток превращения сахаров направлен на образование крахмала в результате фиксации CO_2 ($V=1$), окислительные реакции пентозофосфатного пути «выключены» ($V_{11}=0$). Ацетат поглощается из среды ($V_{35}=2$). При этом в хлоропласте в первичных реакциях фотосинтеза идет интенсивное выделение кислорода ($V_2=6$). Поток электронов от воды полностью идет на восстановление молекул NADPH ($V_{19}=6$), которые идут в цикл Кальвина для синтеза крахмала. Одновременно в митохондриальной ЭТЦ идет активное дыхание ($V_{30}=1$).

На вторые сутки голодания (распределение потоков отражено во второй сверху строчке в столбиках с величинами потоков, рис. 4.13) активность Рубиско падает на 75% по отношению к его активности в первые сутки ($V_1=0.7$). Усиливаются потоки катаболических путей, появляется окислительная реакция пентозофосфатного пути ($V_{11}=0.2$), в которой образуется NADPH. Поток на синтез крахмала уменьшается, увеличивается его распад ($V=0.3$). Поглощение ацетата немного увеличивается ($V_{35}=2.2$). Поток фотосинтетической ЭТЦ, направленный на восстановление NADPH, становится отрицательным ($V_{19}=-1.4$), то есть появляется обратный поток электронов, восстанавливающий пул пластохинонов. В совокупности с появлением потока, осуществляемого пластидной терминальной оксидазой, направленного на восстановление кислорода ($V_{31}=4.6$), это указывает на появление хлородыхания. Также, в соответствии с экспериментальными данными, наблюдается небольшое выделение водорода ($V_{18}=0.3$).

На третьи и четвертые сутки голодания активность Рубиско падает до нуля ($V_1=0.1$; 0), значительно снижается активность фотосистемы II, ($V_2=1.7$; 1). Поглощение ацетата из среды также немного снижается ($V_{35}=1.9$; 1.8). Образование крахмала тормозится, поток, направленный на синтез крахмала,

сменяется на его распад ($V_0=0$; -0.1). Цикл Кальвина перенаправляется на гликолиз. Активизация гликолиза и пентозофосфатного пути приводит к еще большему увеличению образования NAD(P)H ($V_{11}=0.3$; 0.3). Увеличение NAD(P)H происходит также в результате обращения реакций гликолиза ($V_{13}=0.2$; -0.1). Это отражается в увеличении потока, направленного на восстановление пластохинона ($V_{19}=-4.1$; -4.4). Активность Fe-гидрогеназы достигает своего максимального уровня на третьи сутки и затем начинает немного снижаться, скорость выделения водорода и поток на хлородыхание также становятся максимальными на третьи сутки ($V_{18}=1$; 0.9 , $V_{31}=4.8$; 4.5).

Анализ модели, отражающей распределения центральных метаболических потоков, сопряженных с потоками электронного транспорта на мембранах тилакоида и митохондрии в клетках водоросли *C.reinhardtii* в условиях серного голодания, позволяет предложить следующую последовательность изменений метаболических процессов в клетке в соответствии с используемыми экспериментальными данными [Zhang et al. 2002].

В начале голодания, когда еще не активировались процессы деструкции, вызванные голоданием, и компенсирующие их процессы, активно работает ФСII и цикл Кальвина, что сопровождается накоплением крахмала. Далее недостаток серы начинает влиять на синтез белков, в первую очередь наиболее чувствительных к недостатку серу. К таким белкам относится Рубиско, осуществляющий реакцию фиксации CO_2 . Снижение активности Рубиско приводит к уменьшению метаболического потока с участием этого фермента и, как следствие, к постепенной инактивации цикла Кальвина. Далее начинают увеличиваться потоки обратных реакций, и происходит постепенное изменение направлений метаболических путей. Модель показывает, что направление метаболизма меняется с синтеза шестиуглеродных сахаров на их распад, т.е. с глюконеогенеза и цикла Кальвина на гликолиз и окислительный пентозофосфатный путь. Накопление крахмала достигает своего максимума и начинается его распад. В литературе существует различные предположения о

причинах усиления хлородыхания в процессе серного голодания. Предполагается, что такое усиление может происходить либо за счет образования NAD(P)H в гликолизе при расщеплении крахмала, либо за счет увеличения митохондриального NAD(P)H в результате инактивации дыхания [Antal et al. 2011]. Модель показывает, что в первые дни голодания увеличение хлородыхания происходит в основном за счет митохондриального NAD(P)H, и только на 4-й день голодания добавляется NAD(P)H, образующийся в гликолизе. Накопление NAD(P)H активирует пути хлородыхания на мембранах тилакоидов и выделение водорода, что позволяет клетке избежать окислительного стресса. Одновременная инактивация ФСII приводит к уменьшению выделения кислорода кислородвыделяющим комплексом. Содержание кислорода в культуре клеток в результате дыхания уменьшается почти до нуля. Известно, что кислород является ингибитором гидрогеназы, катализирующей реакцию выделения водорода [Forestier et al. 2003, Posewitz et al. 2005], поэтому следствием уменьшения концентрации кислорода является еще большая активация пути выделения водорода.

Несмотря на то, что существуют данные о геноме и, соответственно, о полном наборе метаболических реакций, представленная модель не включает весь набор метаболических реакций. Основной задачей было получить на относительно простой модели, включающей только потоки центрального метаболизма, представление об изменении направления протекания реакций в процессе голодания. Для этого были введены дополнительные стехиометрические соотношения на входящие потоки, позволяющие учесть переключения с одного источника углерода на другой при истощении какого-либо из них. Введенные соотношения в совокупности с оценкой изменения входящих потоков в процессе голодания по экспериментальным данным позволили получить распределение потоков и их перенаправление в процессе голодания и для всей схемы.

Построенная модель является довольно грубой, поскольку включает лишь относительно небольшое число метаболических потоков по сравнению с общим

числом реакций в клетке. Однако использование экспериментальных данных, соответствующим внешним «входам» и «выходам» в модели, тем не менее, позволяет получить качественную картину распределения внутренних метаболических потоков. Заданные величины «внешних» потоков модели (серые столбики, рис. 4.13) однозначно, в соответствии со стехиометрией, определяют распределение внутренних потоков (бесцветные столбики, рис. 4.13). Таким образом, зная «внешние» потоки, определенные из экспериментальных данных, можно рассчитать те изменения, которые претерпевают все остальные потоки.

4.3. Выводы по главе 4

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.

Результаты главы 4 представлены в работах:

1. 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.
2. 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.

3. 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. (Институт компьютерных исследований. Москва-Ижевск). – 2017. – С. 420–443.

Глава 5. Модель переходных процессов у *Chara corallina* при изменении световых режимов

В данной главе представлена модель для анализа переходных процессов в клетках *Chara corallina* при изменении световых режимов. Для многих растительных организмов экспериментально показано, что вдоль внешней поверхности плазматической мембраны могут возникать участки, различающиеся по значениям pH и трансмембранного потенциала [Weisenseel et al. 1979, West et al. 2002, Serikawa et al. 2000, Miller et al. 1986, Feijo et al. 1999]. Так, для корней, корневых волосков и пыльцевых трубок многих растений показано, что неравномерное распределение потенциала играет важную роль в процессах дифференциации тканей и роста [Weisenseel et al. 1979, West et al. 2002, Serikawa et al. 2000, Miller et al. 1986], а пространственное распределение электрических потоков протонов у зигот водорослей *Pelvetia*, *Fucus* определяет дальнейшую структуру клетки [Feijo et al. 1999].

Клетки водорослей *Chara corallina* и *Nitellopsys abtusa* являются удобным объектом для изучения такого рода нелинейных электрофизиологических явлений, так как обладают большими размерами (диаметром 0.6 - 1.0 мм и длиной 40-80 мм) и имеют более простое строение по сравнению с клетками высших растений или животных. В семействе *Characeae* в результате освещения в течение 10-40 минут вдоль клеточной мембраны возникают устойчивые зоны с различными значениями pH и электрического потенциала, между которыми циркулируют токи порядка 1 мкА [Fisahn 1995, Walker et al. 1977]. Изменения значений трансмембранного потенциала и pH вблизи мембраны могут носить колебательный характер. Так, в работах [Fisahn et al. 1986, Fisahn et al. 1989] было показано, что при освещении клетки *Nitella* могут возникать как спонтанные незатухающие колебания трансмембранного потенциала, так и затухающие колебания. Колебания могут быть связаны с зонами, но могут возникать и независимо от зонообразования [Boels et al. 1982, Hansen 1978]. Поскольку подобные явления имеют место в клетках и органах различных растительных организмов, можно предположить, что существует общий механизм

возникновения пространственно-временной неоднородности в примембранной области клетки, связанный с процессами переноса ионов и изменений трансмембранного потенциала. Первоначально наблюдаемые явления связывали со структурной неоднородностью мембран. Однако все большее число исследователей склоняется к тому, что такие явления обусловлены, по-видимому, спецификой работы транспортных систем клетки: АТФ-аз, каналов, антипортеров и т.д. и неоднородным распределением потоков ионов [Toko et al. 1985, Toko et al. 1988, Bulychев et al. 2001, Leonetti et al. 1994].

Был предложен ряд математических моделей [Toko et al. 1985, Toko et al. 1988, Leonetti et al. 1994, Bulychев et al. 2001], в которых рассматриваются возможные механизмы зонообразования. В работе [Toko et al. 1985] предложена модель, основанная на электрических характеристиках плазмалеммы, которая описывает неоднородное распределение потенциала, однако в ней не учитывается изменение концентрации ионов снаружи и внутри клетки. Модель [Toko et al. 1988] адекватно описывала появление структур рН при превышении некоторого порога интенсивности света и дальнейшее увеличение их числа с повышением интенсивности. Моделирование процесса установления чередующихся зон рН вдоль клетки *Chara* получило дальнейшее развитие в работе [Leonetti et al. 1994], в которой рассматривались потоки протонов H^+ и бикарбонат-ионов HCO_3^- через мембрану и стационарное электрическое поле, создаваемое этими ионами. В работе [Bulychев et al. 2001] была разработана модель, где также рассматривались потоки H^+ и HCO_3^- . Предполагалось, что их взаимодействие и различия в коэффициентах диффузии дает основной вклад в образование чередующихся зон с разными величинами рН.

5.1. Формулировка модели зонообразования рН вдоль клеточной мембраны *Chara corallina*

В данной главе разрабатывается модель, описывающая возникновение нелинейных динамических режимов, таких как колебания и диссипативные структуры за счет нелинейной организации мембранной транспортной системы переноса протонов. Механизм переноса протонов был описан исходя из

представления о каталитическом цикле АТФ-азы [Morsomme et al. 2000], а также особенностей работы ионных каналов. Характер распределения потенциала вдоль мембраны описывался исходя из кабельных свойств клеточной мембраны.

5.1.1. Модель протонной АТФ-азы

При построении модели предполагалось, что основным процессом, определяющим нелинейный характер изменений мембранного потенциала, является перенос ионов, в частности протонов, через мембрану. Авторами [Takeuchi et al. 1985, Tazava 2003] было показано, что величина потока протонов через АТФ-азу намного выше, чем величина потоков всех остальных ионов. Авторами [Shartz et al. 1992, Sanders et al. 1981] утверждалось, что основной вклад в общий поток ионов через мембрану дают протоны, поэтому при построении модели в данной работе учитывалась конкретная кинетика именно протонного переноса. Существует большое количество экспериментальных данных о работе протонной АТФ-азы [Tazava 2003, Shartz et al. 1992, Sanders et al. 1981, Fisahn et al. 1992]. Протонная помпа «откачивает» ионы H^+ из цитоплазмы во внеклеточную среду, а по пассивным каналам ионы H^+ возвращаются в клетку. Высказывались предположения, что АТФ-аза и протонные каналы структурно связаны между собой в единую транспортную систему [Fisahn et al. 1992].

Для задания конкретного вида потока протонов через H^+ -АТФ-азу была рассмотрена кинетическая схема работы этого фермента (рис. 5.1). Предполагалось, что фермент имеет два сайта связывания субстрата (протонов). Связывание протона одним сайтом не зависит от связывания другого протона другим сайтом. Константы k_1 (моль $\cdot$ с $^{-1}$ $\cdot$ м $^{-3}$); k_{-1} (с $^{-1}$) - характеризуют присоединение и отщепление протона, множитель 2 (в выражениях $2k_{-1}, 2k_1H_i$) характеризует равновероятную возможность связывания субстрата любым из сайтов, либо отсоединения от любого из сайтов.

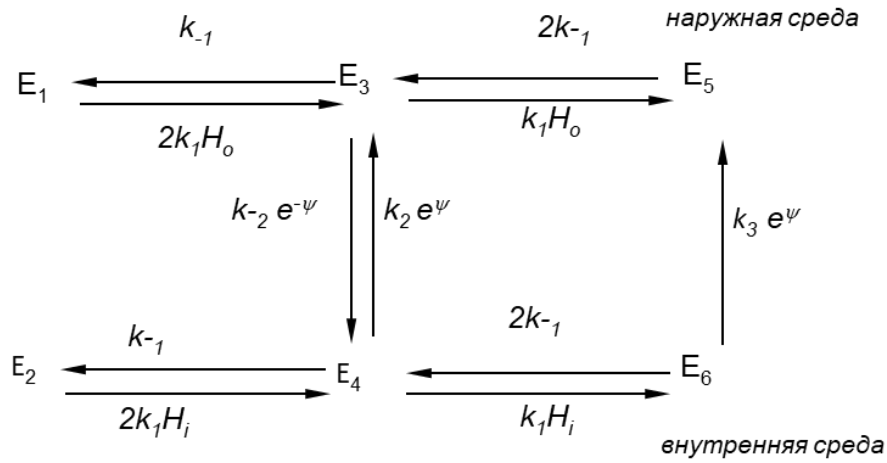


Рисунок 5.1 – Кинетическая схема работы фермента, в которой реализуются шесть конформационных состояний *Out* – внешняя сторона мембраны, *In* – внутренняя сторона мембраны, H_i – концентрация протонов в цитоплазме, H_o – концентрация протонов снаружи клетки. $E_1, E_2, E_3, E_4, E_5, E_6$ – конформационные состояния фермента. $k_2^0e^{\psi}$, $k_{-2}^0e^{-\psi}$, $k_3^0e^{\psi}$ – потенциал зависимые константы переноса протона с внутренней стороны мембраны на внешнюю. (Биофизика 2005)

Константы k_2 (с^{-1}), k_3 (с^{-1}) характеризуют перенос протона через мембрану во внешнюю среду, k_{-2} (с^{-1}) – перенос протонов в клетку. Вероятность переноса протонов через мембрану зависит от трансмембранного потенциала φ [Takeuchi et al. 1985, Kishimoto et al. 1984, Lauger et al. 1970, Lauger 1979]. Вероятности переноса соответствуют кинетическим константам электрогенного перехода k_{-2} , k_2 и k_3 , поэтому в модели константы переноса протона с одной стороны мембраны на другую зависят от потенциала φ следующим образом: $k_{-2} = k_{-2}^0 \exp\left(-\frac{F\varphi}{2RT}\right)$, $k_2 = k_2^0 \exp\left(\frac{F\varphi}{2RT}\right)$ и $k_3 = k_3^0 \exp\left(\frac{F\varphi}{2RT}\right)$. Предполагалось, что вероятность переноса с внешней стороны мембраны на внутреннюю двух протонов мала, поэтому переход из E_5 в E_6 , соответствующий переносу второго протона, в данной схеме не рассматривается.

На основании кинетической схемы была записана следующая система кинетических уравнений:

$$\frac{d[H_o]}{dt} = k_{-1}[E_3] - 2k_1[H_o][E_1] - k_1[H_o][E_3] + 2k_{-1}[E_5] \quad (5.1)$$

$$\frac{d[E_1]}{dt} = k_{-1}[E_3] - 2k_1[H_o][E_1]$$

$$\frac{d[E_2]}{dt} = k_{-1}[E_4] - 2k_1[H_i][E_2]$$

$$\frac{d[E_3]}{dt} = 2k_1[H_o][E_1] - k_{-1}[E_3] + 2k_{-1}[E_5] - k_1[H_o][E_3] - k_{-2}[E_3] + k_2[E_4]$$

$$\frac{d[E_4]}{dt} = 2k_1[H_i][E_2] - k_{-1}[E_4] + 2k_{-1}[E_6] - k_1[H_i][E_4] + k_{-2}[E_3] - k_2[E_4]$$

$$\frac{d[E_5]}{dt} = k_3[E_6] + k_1[H_o][E_3] - 2k_{-1}[E_5]$$

$$[E_1] + [E_2] + [E_3] + [E_4] + [E_5] + [E_6] = E_0,$$

где $[H_o]$ – концентрация протонов в среде (моль·м⁻³), $[H_i]$ – концентрация протонов в цитоплазме (моль·м⁻³). В рассматриваемом варианте модели $[H_i]$ является параметром, $[E_1]$ – $[E_6]$ концентрации фермента в различных конформационных состояниях (моль·м⁻³). $[E_1]$ – концентрация фермента в активном состоянии, $[E_2]$ – в неактивном состоянии, $[E_3]$, $[E_4]$ – концентрации фермента, в состоянии, когда один из сайтов занят субстратом, $[E_5]$, $[E_6]$ – концентрации фермента, в состоянии, когда два сайта заняты субстратами. E_0 – полная концентрация фермента.

Первое уравнение системы (5.1) описывает изменение концентрации протонов $[H_o]$ снаружи клетки за счет работы АТФ-азы. Последнее уравнение следует из допущения о постоянстве концентрации фермента во всех состояниях Н⁺-АТФ-азы. Остальные пять уравнений описывают изменение концентраций различных форм фермента. Поскольку конформационные изменения АТФ-азы происходит намного быстрее, чем изменение концентрации протонов во внешней среде, состояние фермента в любой из форм можно рассматривать как квазистационарное и свести уравнения, описывающие изменения концентраций всех форм фермента к алгебраическим. Далее было предположено, что процессы переноса протонов с одной стороны мембраны на другую ($E_4 \leftrightarrow E_3$, $E_6 \rightarrow E_5$, происходят гораздо медленнее по сравнению с процессами присоединения и отщепления протонов ($E_1 \leftrightarrow E_3$, $E_3 \leftrightarrow E_5$, $E_2 \leftrightarrow E_4$, $E_4 \leftrightarrow E_6$, рис. 5.1), что позволило

упростить уравнение для изменения концентрации протонов во внешней среде. Общее изменение концентрации протонов снаружи мембраны клетки зависит не только от потока через АТФ-азу, но и от обмена протонов между средой и клеткой. Кроме того, происходит диффузия протонов вдоль мембраны клетки. Поскольку длина клетки водоросли *Chara corallina* (~4-6 см) во много раз превышает ее диаметр (~1 мм), диффузия протонов рассматривалась вдоль одной пространственной координаты x . Общее уравнение для суммарного изменения концентрации протонов снаружи клетки в безразмерных переменных выглядит следующим образом:

$$\frac{\partial h_0}{\partial \tau} = \frac{h_0 e^{\psi(1-n)}}{2qh_0 + e^{2\psi}(1+h_0)^2(n+1)} - \gamma h_0 + D_1 \frac{\partial^2 h_0}{\partial r^2}, \quad (5.2)$$

где $h_0 = \frac{[H_0]}{K_1}$, $\tau = \frac{t}{t_0}$, $t_0 = \frac{K_1}{k_{-2}[E_0]}$, $r = \frac{x}{L}$, L – длина клетки.

$$\psi = \frac{\varphi F}{2RT}, \quad n = \frac{1}{K_3 h_i + 1}, \quad q = \frac{(1+h_i)^2 K_2 n}{h_i}, \quad h_i = \frac{[H_i]}{K_1}, \quad K_1 = \frac{k_{-1}}{k_1}, \quad K_2 = \frac{k_{-2}}{k_2}, \quad K_3 = \frac{k_3}{2k_2}.$$

Первый член описывает поток протонов через АТФ-азу, второй член γh_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 АТФ-азой, внутрь клетки. $D_1 = \frac{Dt_0}{L^2}$, где D – коэффициент диффузии протонов вдоль поверхности клетки.

5.1.2. Уравнение изменения потенциала

Уравнение распределения трансмембранного потенциала было записано исходя из кабельных свойств мембраны клетки (рис. 5.2) с учетом ионных токов через мембрану [Hodgkin et al. 1952]:

$$\frac{p}{2R_i} \frac{\partial^2 \varphi}{\partial x^2} = -(I_{ATP} + I_l) + C \frac{\partial \varphi}{\partial t}, \quad (5.3)$$

где полный ток через мембрану ($\frac{p}{2R_i} \frac{\partial^2 \varphi}{\partial x^2}$) равен сумме емкостного ($C \frac{\partial \varphi}{\partial t}$) и ионного (I) токов. Ионный ток (I) состоит из тока протонов через АТФ-азу (I_{ATP}) и тока утечки (I_l), включающего в себя потоки остальных ионов.

Здесь φ – трансмембранный потенциал (В), R_i – сопротивление цитоплазмы (Ом·м); C – емкость мембраны (мкФ·м⁻²), $I_{ATP} = E_0 k_{-2} \frac{\frac{H_0}{K_1} e^{\psi(1-n)}}{2q \frac{H_0}{K_1} + e^{2\psi} (1 + \frac{H_0}{K_1})^2 (n+1)} Fp$ – ток через H⁺-АТФ-азу (А·м⁻²); I_l – ток утечки, включающий потоки других ионов (А·м⁻²), F – число Фарадея (Кл·моль⁻¹), p – диаметр клетки (м). Ток утечки записывается как $I_l = \bar{g}(\varphi - \varphi_0)$, где $\bar{g}$ – проводимость пассивных каналов, (Ом⁻¹·м⁻²); φ_0 – потенциал покоя на плазматической мембране (В).

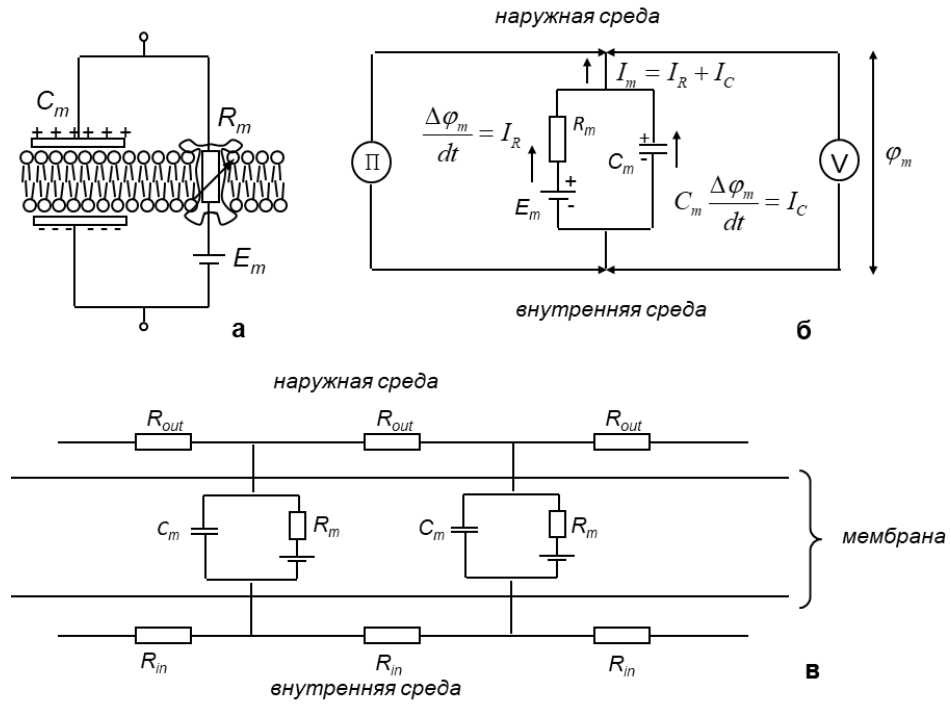


Рисунок 5.2 – Схемы, отражающие электрические свойства клеточной мембраны: а – эквивалентная электрическая схема, состоящая из конденсатора (C_m), роль которого играет липидный бислой, сопротивления (R_m) характеризующее проводимость ионных каналов, находящиеся в открытом и закрытом состоянии, и батареи (E_m), создающей разность потенциалов между внешней и внутренней средой клетки; б – схема участка мембраны, цепь содержит батарею E_m , создающую потенциал покоя, сопротивление R_m и емкость C_m . в – эквивалентная электрическая схема клетки *Chara* в виде кабеля, где участки мембраны связаны между собой сопротивлениями внутренней аксоплазмы (R_{in}) и наружного раствора (R_{out}).

Окончательное уравнение изменения трансмембранного потенциала ψ вдоль клетки водоросли в безразмерных переменных имеет вид:

$$\frac{\partial \psi}{\partial \tau} = \frac{-h_0 e^{\psi(1-n)}}{2q h_0 + e^{2\psi} (1 + h_0)^2 (n+1)} z - g(\psi - \psi_0) + D_2 \frac{\partial^2 \psi}{\partial r^2} \quad (5.4)$$

$$\text{где } \psi = \frac{\varphi F}{2RT}, \bar{g} = \frac{gt_0}{C}, z = \frac{pF^2 K_1}{CRT}, \psi_0 = \frac{\varphi_0 F}{2RT}, D_2 = \frac{pt_0}{2L^2 R_i C}.$$

Полученная система уравнений изменения трансмембранного потенциала и концентрации протонов снаружи клетки выглядит следующим образом:

$$\frac{\partial h_0}{\partial \tau} = \frac{h_0 e^{\psi(1-n)}}{2qh_0 + e^{2\psi}(1+h_0)^2(n+1)} - \gamma h_0 + D_1 \frac{\partial^2 h_0}{\partial r^2} \quad (5.5)$$

$$\frac{\partial \psi}{\partial \tau} = \frac{-h_0 e^{\psi(1-n)}}{2qh_0 + e^{2\psi}(1+h_0)^2(n+1)} z - g(\psi - \psi_0) + D_2 \frac{\partial^2 \psi}{\partial r^2}.$$

В качестве условия на границах принималось отсутствие потока протонов и градиента потенциала на торцах клетки: $\frac{\partial h_0}{\partial r}(0, \tau) = \frac{\partial h_0}{\partial r}(1, \tau) = 0$,

$$\frac{\partial \psi}{\partial r}(0, \tau) = \frac{\partial \psi}{\partial r}(1, \tau) = 0$$

5.1.3. Идентификация параметров модели по экспериментальным данным

Для того, чтобы определить допустимые пределы изменения кинетических параметров АТФ-азы в модели, была проведена идентификация параметров модельного тока через мембрану по экспериментальной вольт-амперной кривой (зависимости тока через мембрану от величины трансмембранного потенциала), приведенной в работе [Takeuchi et al. 1985] (рис. 5.3).

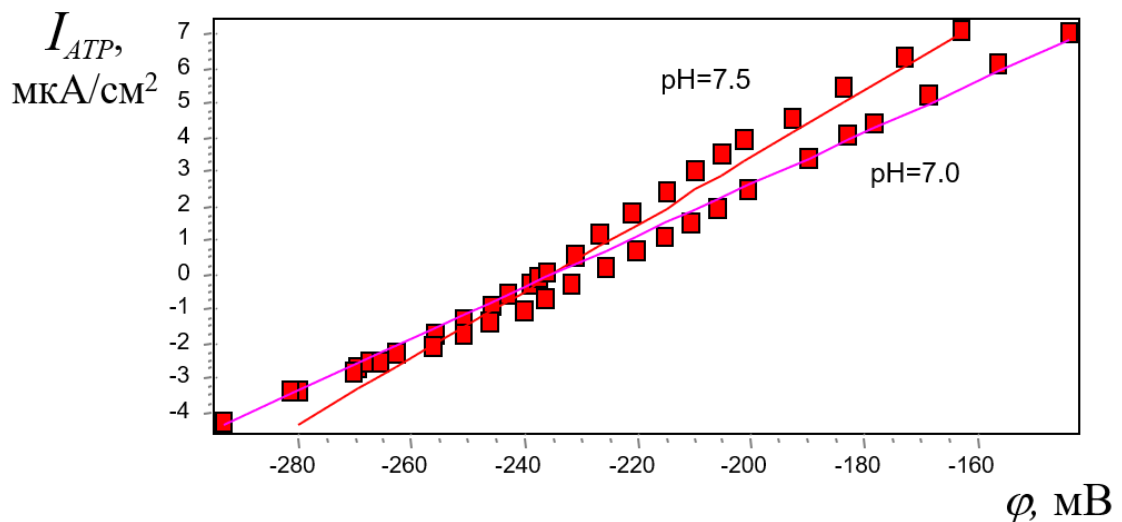


Рисунок 5.3 – Вольтамперная характеристика ионного тока через мембрану клетки *Chara corallina*. Квадраты - экспериментальные точки [Takeuchi Y. et al., 1985], сплошные линии – модельные кривые.

В результате процедуры идентификации были получены следующие значения параметров: $K_1 = 5.02 \cdot 10^{-7}$ моль $\cdot$ м $^{-3}$, $k_{-2} = 3.36 \cdot 10^9$ с $^{-1}$, $n = 0.912$, $q = 0.0948$. Остальные параметры были взяты из литературы: $E_0 = 5 \cdot 10^{-12}$ моль $\cdot$ м $^{-3}$ [Takeuchi et al. 1985], $p = 1$ мм [Fisahn et al. 1995, Walker et al. 1977], $\bar{g} = 3.12$

$\text{Ом}^{-1} \cdot \text{м}^{-2}$ [Кольс и др. 1993], $\varphi_0 = -220 \text{ мВ}$ [Sanders et al. 1981], $[H_i] = 10^{-7} \text{ моль} \cdot \text{м}^{-3}$ (pH=7) [Felle et al. 1986].

5.1.4. Ответ системы на включение/выключение света

В большинстве экспериментов [Walker et al. 1977, Bulyshev et al 2001, Lucas et al. 1980] процесс зонообразования зависит от интенсивности освещения. В экспериментах [Felle et al. 1986] было показано, что при освещении клетки pH цитоплазмы может увеличиваться. В связи с этим в модель была в явном виде введена зависимость концентрации протонов в цитоплазме h_i от интенсивности света I : $h_{in} = h_{in}^0 e^{-I}$, где $I = \frac{\tilde{I}}{I_0}$ - безразмерная величина. $\tilde{I}$ - величина интенсивности света, используемая в лабораторных экспериментах (Вт/м^2), h_{in}^0 - концентрация протонов в цитоплазме в отсутствии освещения. Было показано [Bulyshev et al. 2002], что в диапазоне интенсивностей от 10 до 100 Вт/м^2 амплитуда структур меняется слабо, и в этом случае I_0 - это насыщающая интенсивность света, выбранная из указанного диапазона интенсивностей. Так как pH цитоплазмы в экспериментах менялось в пределах от 6.9 до 7.8 [Felle H., 1986; Walker N., 1975], то соответственно диапазон изменений безразмерной концентрации h_{in} составлял 8 – 21, при этом значение I_0 выбиралось таким образом, чтобы $h_{in} = h_{in}^0 e^{-I}$, менялась в пределах 8 до 21. Расчетная величина I_0 составила 40 Вт/м^2 .

Валидность модели при описании ответа на изменение светового режима оценивали путем сопоставления модельных расчетов с экспериментальными данными [Shartz et al. 1992, Fisahn et al. 1989], в которых исследовали динамику pH и трансмембранного потенциала в ответ на включение и выключение света. Динамика потенциала и pH обычно измеряется в выбранной точке в кислой, либо в щелочной зоне. На рисунке 5.4 а приведен эксперимент, описанный в [Shartz et al. 1992], в котором было показано, что при выключении света сначала наблюдается понижение потенциала (гиперполяризация) и затем повышение (деполяризация), а при включении происходит быстрая деполяризация потенциала. Величины изменения трансмембранного потенциала ($\Delta\varphi$) могут

колебаться в пределах от 60 мВ до 100 мВ. Аналогичные результаты были получены и в модельном эксперименте (рис. 5.4 б). При выключении света ($I=0$) наблюдается быстрое понижение (гиперполяризация) потенциала с последующей деполяризацией, при включении света ($I=0.2$) быстрая деполяризация ($\Delta\varphi=200$ мВ) сменяется медленной гиперполяризацией ($\Delta\varphi=10$ мВ) до нового стационарного уровня ($\varphi = -150$ мВ) (размерные величины были пересчитаны из безразмерных в соответствии с выражениями, приведенными при формулировке модели).

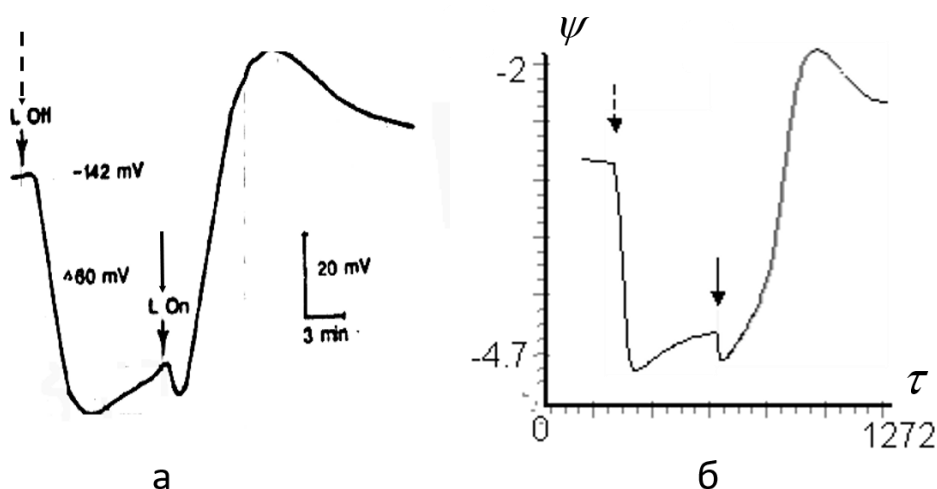


Рисунок 5.4 – Динамика мембранного потенциала в ответ на включение и выключение света: а – эксперимент [Shartzet S.A., 1992]; б – изменения мембранного потенциала в модельном эксперименте. Пунктирной стрелкой показано выключение света, сплошной – включение. .

Параметры модели: $g=0.03$, $\gamma = 0.0085$, $\psi_0 = -1.28$, $z = 0.6$, $K_2=5.1 \cdot 10^{-5}$, $g = 0.03$, $K_4 = 0.005573$, $h_i^0 = 21$.

Таким образом, модель адекватно описывает локальный ответ системы на изменение светового режима.

5.2. Нелинейные режимы в локальной системе

Авторы [Fisahn et al. 1986, Fisahn et al. 1989] наблюдали как затухающие, так и незатухающие колебания мембранного потенциала и pH вблизи поверхности клетки *Nitella* при одинаковых условиях эксперимента (интенсивность освещения $20 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$). Затухающие колебания мембранного потенциала с периодом 2 минуты наблюдались при изменении темновых условий на световые. Незатухающие колебания с периодом около 15 минут возникали спонтанно на свету. Такой характер колебаний в экспериментах позволил

предположить, что в системе может возникать докритическая бифуркация Андронова-Хопфа, при которой происходит жесткое рождение предельного цикла и в зависимости от начальных условий система может переходить либо в состояние устойчивого фокуса, либо – стремиться к устойчивому предельному циклу.

Численное исследование системы (5.5) показало, что в ней возможны несколько стационарных состояний (триггер), однако ввиду сложности системы (5.5) аналитически найти общее выражение для стационарных значений переменных $\bar{\psi}$ и $\bar{h}$ не представлялось возможным. Поэтому для дальнейшего аналитического исследования были выбраны фиксированные стационарные значения переменных $\bar{\psi} = -4.7, \bar{h} = 21$, реализующиеся в темновых условиях ($I=0$). Для исследования существования различных режимов в качестве управляющего параметра была выбрана интенсивность света I при фиксированных значениях остальных параметров. Далее для ряда значений интенсивности I (интенсивность изменялась интервале от 0 до 0.2, с шагом 0.01), был получен численный ряд стационарных значений переменных (бифуркационная диаграмма на рисунке 5.5.а). Для каждого стационарного состояния был проведен линейный анализ системы и найдены критические значения параметра интенсивности света I , при которых происходит изменение типа стационарного состояния и потенциально могут возникнуть бифуркации рождения предельного цикла. Далее система была исследована численно вблизи выбранных особых точек. Было получено, что при $I=0$ в системе реализуется устойчивый узел (рис. 5.5 а, ветвь 1), который при $I=0.0428$ переходит в устойчивый фокус. При повышении интенсивности света в системе возникает мультистационарность, появляются седло (рис. 5.5 а, ветвь 2) и неустойчивый фокус (рис. 5.5 а, ветвь 3) при $I=0.1374$. При дальнейшем увеличении интенсивности до $I=0.1627$ происходит бифуркация, в результате которой неустойчивый фокус переходит в устойчивый, вокруг которого возникает неустойчивый предельный цикл (рис. 5.5 а, ветвь 3). При достижении значения $I=0.1789$ рождается устойчивый предельный цикл большой амплитуды,

охватывающий оба устойчивых стационарных состояния (рис. 5.5 б), который при дальнейшем увеличении интенсивности до значения $I=0.1826$ вновь исчезает, при этом исчезает и неустойчивый предельный цикл вокруг устойчивого фокуса на ветви 3 и появляется неустойчивый предельный цикл вокруг устойчивого фокуса на ветви 1 (рис. 5.5 в). При достижении значения $I=0.2$ в системе остается одно устойчивое состояние- устойчивый узел.

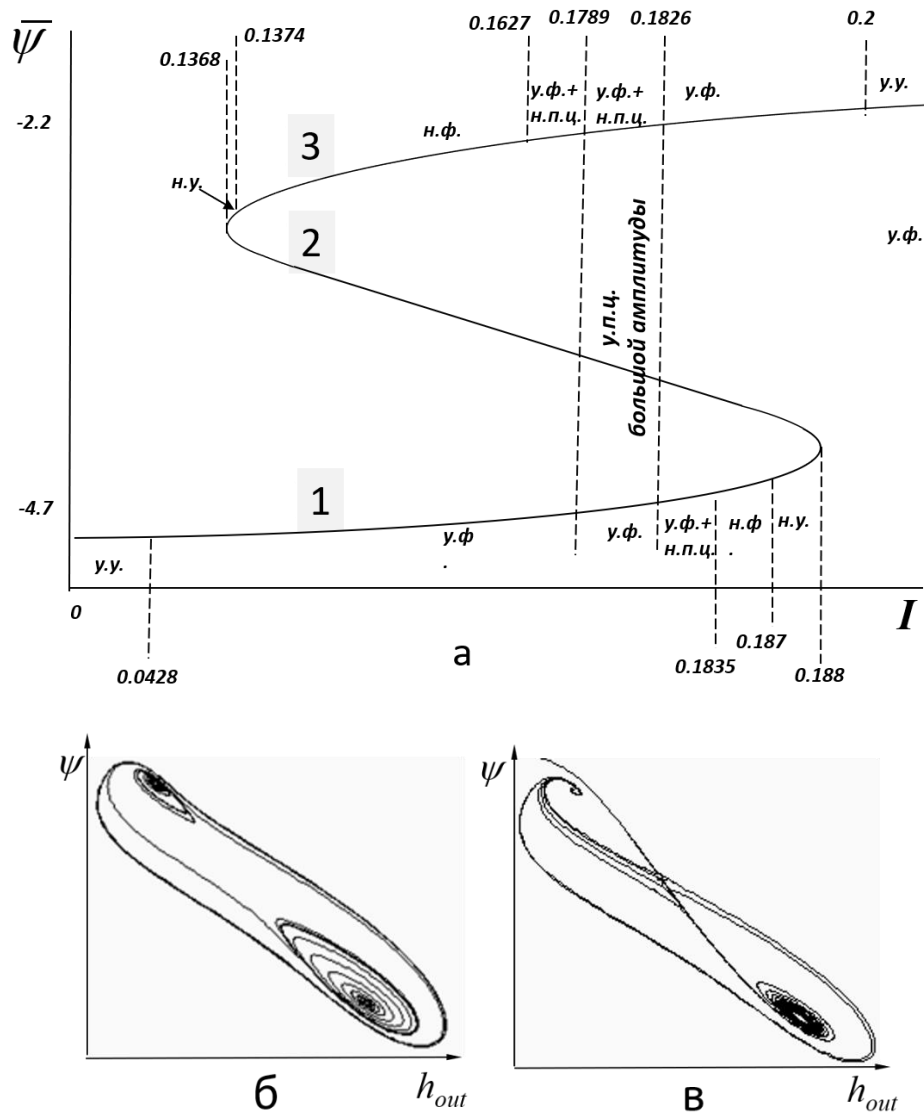


Рисунок 5.5 – Нелинейные режимы в системе (5.5): а – бифуркационная диаграмма, отображающая зависимость количества стационарных состояний и их типов от параметра интенсивности света I ; у.у. – устойчивый узел, н.у. – неустойчивый узел, у.ф. – устойчивый фокус, н.ф. неустойчивый фокус, у.п.ц. – устойчивый предельный цикл, н.п.ц. – неустойчивый предельный цикл; б – фазовый портрет при $I = 0.18$; в – фазовый портрет при $I = 0.185$.

Таким образом, при изменении освещенности от $I=0$ и до $I=0.2$ система может перейти из одного устойчивого состояния $\bar{\psi} = -4.7, \bar{h} = 21$ в другое с

более высоким значением мембранного потенциала $\bar{\psi} = -2.2$, $\bar{h} = 6.7$, такой переход характеризуется многоэтапностью и многообразием нелинейных режимов. Обнаруженная в модели зависимость характера колебательного режима (устойчивый фокус или предельный цикл) от начальных условий при одном и том же значении параметра интенсивности освещения I указывает на то, что в системе возникает докритическая бифуркация Андронова-Хопфа, что объясняет экспериментально наблюдаемую динамику (затухающие или незатухающие колебания) при одинаковой интенсивности освещения в экспериментах [Fisahn et al. 1986, Fisahn et al. 1989].

5.3. Распределенная система

Далее была исследована система (5.5) с учетом диффузии. В результате линейного анализа были получены параметры системы, при которых в системе возникает неустойчивость Тьюринга. Найденные параметры использовались для численного счета. Решение системы дифференциальных уравнений в частных производных проводилось с помощью программы, разработанной в [Plusnina et al. 2002]. В качестве начальных условий принимались малые отклонения от стационарных значений.

5.3.1. Диссипативные структуры

Как указывалось в работах [Bulychev et al. 2002; Lucas et al. 1975], кислые и щелочные зоны вдоль мембраны клетки водоросли возникают при освещении клеток светом выше некоторой критической величины. Пороговое значение освещенности сильно варьирует в зависимости от физиологического состояния клетки и может составлять для разных клеток от 0.5 до 2 Вт/м². Профиль pH, возникающий при освещении клетки светом надпороговой интенсивности (100 Вт/м²), имеет вид хорошо выраженных зон, которые можно соотнести со структурами Тьюринга (рис. 5.6 а). В результате линейного анализа распределенной модели было найдено критическое значение параметра I , при котором в системе возникают диссипативные структуры. Численное исследование подтвердило, что при найденном критическом значении возникают

диссипативные структуры, соответствующие зонам с различным значением pH (5.6 б).

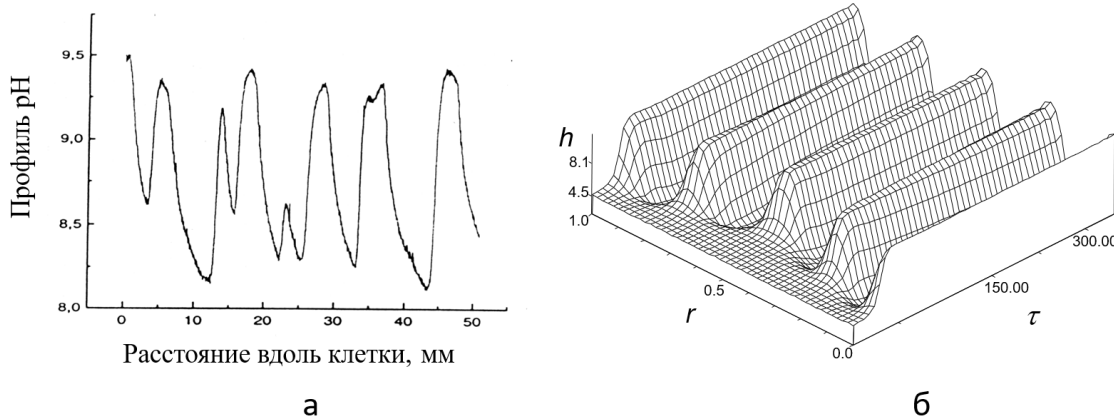


Рисунок 5.6 – Изменения pH вблизи внешней стороны мембраны клетки водоросли *Chara corallina*: а – профиль pH, измеренный вдоль внешней стороны мембраны клетки в [Bulychev et al. 2001]. б – возникновение pH зон (диссипативных структур), полученное в модели; r - пространственная координата (соответствует длине клетки), τ - время. Параметры модели: $z=1$, $\gamma=0.025$, $V=0$, $g=0.08$, $\psi_0=-1.335$, $I=0.6$, $D_1=10^{-5}$, $D_2=9\cdot 10^{-5}$.

При увеличении интенсивности света амплитуда структур росла, что согласуются с экспериментальными данными [Fisahn et al. 1989]. Таким образом, модель адекватно описывает как колебательные режимы, так и возникновение пространственной неоднородности, обнаруженные в экспериментах [Bulychev et al. 2001, Fisahn et al. 1995, Walker et al. 1977, Fisahn et al. 1986, Fisahn et al. 1989].

5.3.2. Гистерезис в распределенной системе

В работе [Bulychev et al. 2003] было обнаружено, что в определенном диапазоне освещенности одной и той же величине интенсивности света могут соответствовать два состояния в распределении pH: полностью гомогенное состояние и полностью сформированные структуры. Переход к состоянию с высокой амплитудой пиков pH происходит при увеличении интенсивности света, переход к гомогенному состоянию при уменьшении интенсивности света, до значения меньшего, чем то, при котором они возникают, то есть в системе может быть реализован гистерезис (рис.5.7 а).

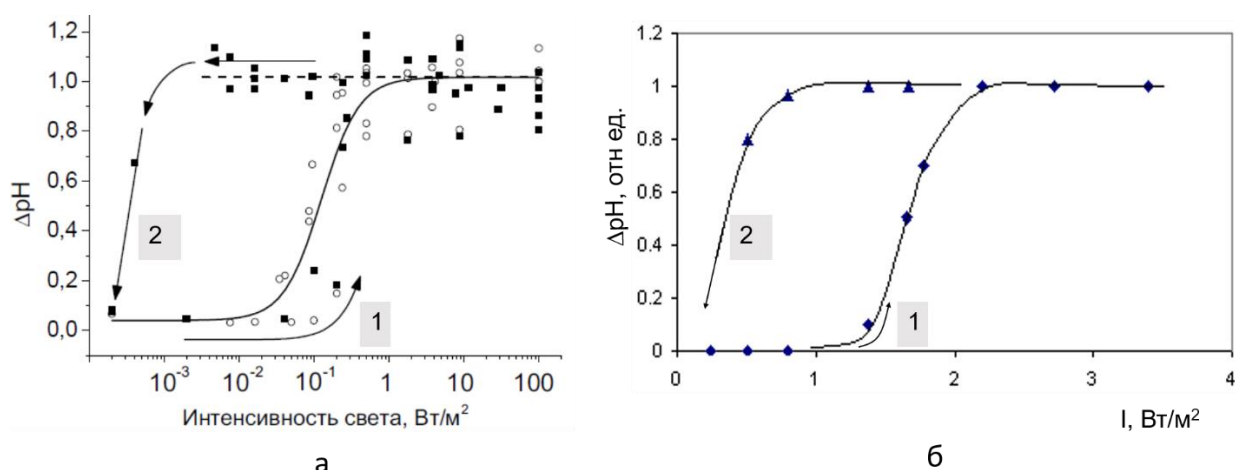


Рисунок 5.7 – Гистерезис распределения pH вблизи мембраны клетки водоросли *Chara corallina*: а – экспериментальный результат, полученный при обработке данных для разных клеток при циклическом повышении и понижении интенсивности действующего света [Bulychev et al. 2003]; светлые кружки обозначают повышение интенсивности, темные квадратики соответствуют понижению интенсивности; б – результат численного эксперимента, изменение максимального перепада pH между щелочными и кислыми зонами (ΔpH) в зависимости от повышения и понижения интенсивности действующего света; ромбики соответствуют повышению интенсивности, треугольники – понижению. Стрелки 1 – увеличение интенсивности света, стрелки 2 – уменьшение интенсивности света.

Лабораторный эксперимент был воспроизведен на модели (рис. 5.7 б). Для модельных экспериментов выбирался ряд значений интенсивности света ($I = 0.006-0.0455$), соответствующий в размерном виде значениям интенсивностей, используемых в лабораторном эксперименте. При этом значение pH цитоплазмы в модели менялось от 6.9 до 7.4. В численном счете было обнаружено, что при увеличении параметра интенсивности в системе возникают pH структуры при значении интенсивности света $I = 0.04$ ($\tilde{I} = 1.78$ W/m^2), при дальнейшем увеличении значения интенсивности их амплитуда остается постоянной. При уменьшении параметра интенсивности через тот же интервал времени структуры исчезают при значении интенсивности, ниже порогового значения $I = 0.006$ ($\tilde{I} = 0.24$ W/m^2). Таким образом, в модельной системе наблюдается гистерезис в изменении pH в зависимости от предыстории световых условий, как это было и в лабораторном эксперименте.

5.4. Модификация модели с учетом изменения pH цитоплазмы

Экспериментально было показано, что pH цитоплазмы является одним из регуляторов протонной АТФ-азы плазматической мембраны [Morsomme P., 2000; Mimura T., 1984; Tazawa M., 1982]. Повышение pH цитоплазмы на свету может

быть связано с процессами на фотосинтетической мембране [Vanselow K. et al., 1989; Kolbowski J. et al., 1984; Felle H., 1986]. Так как в первичных реакциях фотосинтеза происходит «закачка» протонов во внутреннее пространство тилакоидов [Krause G., 1973; Krause G. et al., 1982] и pH стромы повышается, то, по мнению некоторых исследователей [Vanselow K. et al., 1989; Hansen U. et al., 1987] на мембране хлоропластов существуют транспортные системы, за счет которых протоны из цитоплазмы поступают во внутреннее пространство хлоропластов. Одной из характерных черт харовых водорослей является циклозис – движение цитоплазмы со скоростью 10-100 мкм/с [Камия Н., 1962]. Однако, если добавить в среду цитохалазин, ингибитор циклозиса, то зоны pH не появляются даже на высоком свете.

В модели из двух уравнений концентрация протонов в цитоплазме считалась параметром. Однако, исходя из экспериментальных данных, видно, что процессы изменения концентрации протонов в цитоплазме связаны с фотосинтетическими процессами, с работой протонной АТФ-азы и изменениями мембранного потенциала. Более того, остановка циклозиса приводит к исчезновению структур, что невозможно учесть в модели из двух уравнений. Все эти факты указывают на ключевой характер пространственно-временной динамики концентрации протонов в цитоплазме в процессе формирования зон pH и мембранного потенциала вдоль клеточной мембраны и необходимость рассмотрения в модели концентрации протонов в цитоплазме в качестве одной из переменных. Для описания изменения концентрации протонов в цитоплазме предполагалась, что ее величина зависит как от потока протонов через протонную транспортную систему плазматической мембраны J_{ATP} , так и от потока протонов из цитоплазмы через мембрану хлоропластов J_{chl} . Тогда система уравнений с учетом изменения концентрации протонов в цитоплазме и с учетом циклозиса - направленного движения протонов в цитоплазме, диффузия протонов, будет выглядеть следующим образом:

$$\frac{\partial h_o}{\partial \tau} = J_{ATP} - \gamma h_{out} + D_1 \frac{\partial^2 h_{out}}{\partial r^2}, \quad (5.6)$$

$$\frac{\partial \psi}{\partial \tau} = -J_{ATP} z - J_l + D_2 \frac{\partial^2 \psi}{\partial r^2},$$

$$\frac{\partial h_{in}}{\partial \tau} = -J_{ATP} - J_{chl} + B \frac{\partial h_{in}}{\partial r} + D_3 \frac{\partial^2 h_{in}}{\partial r^2}.$$

Переменными модели являются концентрация протонов вблизи внешней стороны мембраны (h_o) и трансмембранный потенциал (ψ) и концентрация протонов в цитоплазме (h_i). Первые два уравнения, как и в предыдущей версии модели, описывают изменение концентрации протонов вблизи внешней стороны мембраны и изменение трансмембранного потенциала. Выражение $J_{ATP} = \frac{h_{in}h_{out}e^{\psi K_3}}{(1+h_{out})^2 e^{2\psi(2+K_3h_{in})} + (1+h_{in})^2 K_2 h_{out}}$ описывает работу транспортной системы АТФазы. Третье уравнение описывает изменение концентрации протонов в цитоплазме за счет потока J_{ATP} через плазматическую мембрану и потока через мембрану хлоропластов $J_{chl} = \frac{(ah_i-1)me^{-I}}{1+h_ib}$. Выражение для потока J_{chl} было выведено из простейшей схемы, реализующей кинетику Михаэлиса-Ментен. Безразмерные переменные модели: $h_o = \frac{[H_{out}]}{K_1}$ – концентрация протонов вблизи внешней стороны мембраны; $\tau = \frac{tk_{-2}[E_0]}{K_1}$ – время, $\psi = \frac{\varphi F}{2RT}$ – трансмембранный потенциал. $h_i = \frac{[H_i]}{K_1}$ – концентрация протонов в цитоплазме. Параметры модели, выраженные через элементарные константы кинетической схемы и электрические характеристики мембраны: $K_1 = \frac{k_{-1}}{k_1}$, $K_2 = \frac{k_{-2}^0}{k_2^0}$, $K_3 = \frac{k_3^0}{2k_2^0}$, $g = \frac{\tilde{g}K_1}{Ck_{-2}[E_0]}$, $z = \frac{pF^2 K_1}{CRT}$, $\psi_0 = \frac{\varphi_0 F}{2RT}$, $m = \frac{t_0 k_2^0 E_{chl} k_{-4} k_{-5} H_{chl}}{K_1 k_5 (k_{-4} + k_{-5} H_{chl} + k_5)}$, $a = \frac{k_4 k_5 K_1}{k_{-4} k_{-5} H_{chl}}$, $b = \frac{k_4 K_1}{k_{-4} + k_{-5} H_{chl} + k_5}$, где H_{chl} – концентрация протонов в строме хлоропластов. E_0 – полная концентрация всех состояний транспортера на плазматической мембране (моль · м⁻³). E_{chl} – полная концентрация всех состояний транспортера на мембране хлоропласта (моль · м⁻³), остальные параметры имеют тот же смысл, что и ранее, в модели из двух уравнений.

Динамика переменных точечной модели (без учета диффузии) была исследована в зависимости от интенсивности света. Была обнаружена нерегулярная динамика pH, сходная с наблюдаемой динамикой в эксперименте [Fisahn et al. 1989] (рис. 5.8).

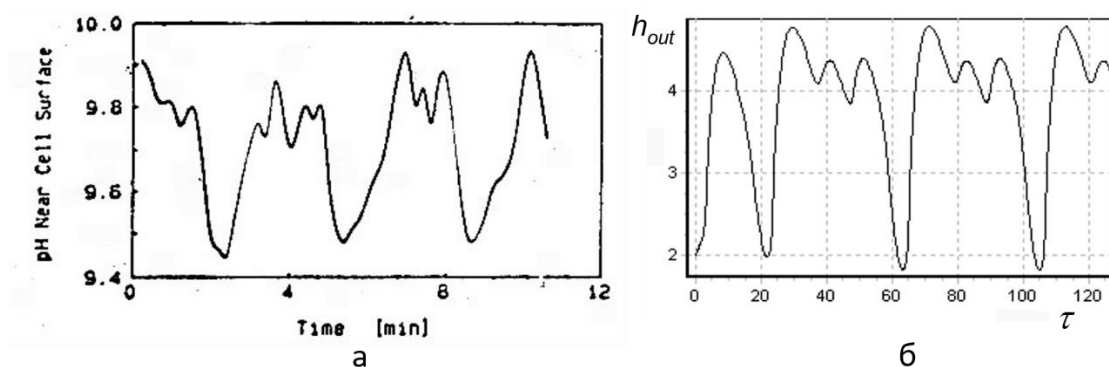


Рисунок 5.8 – Квази-хаотическая динамика pH снаружи клетки харовой водоросли: а – лабораторный эксперимент [Fisahn et al. 1989]; б – модельный эксперимент. Параметры модели: $z=4$, $K_2=0.001$, $K_3=0.5$, $a=0.0596$, $b=0.01$, $m=1.95$, $\gamma=0.339$, $g=1.81$, $\psi_0=-0.21$, $I=2.2$, $\alpha=1$, $\beta=2.424$.

Далее в численном счете были исследованы режимы при постепенном изменении интенсивности света от 0 (свет выключен) до 0.93 (37 Вт/м²-интенсивность света в размерном виде). Кинетика и фазовые портреты приведены на рисунке 5.9. Хаотический режим возникал по сценарию удвоения периода: затухающие колебания потенциала (устойчивый фокус), реализующиеся при $I = I_1$, переходили в незатухающие (устойчивый предельный цикл) при $I = I_2$, далее период колебаний удваивался при $I = I_3$, при дальнейшем увеличении света до $I = I_4$ колебания теряли периодический характер, и устанавливалась квазихаотическая динамика (странный аттрактор) (рис.5.9). При $I = I_5$ колебания вновь становились периодическими и при дальнейшем увеличении интенсивности до $I = I_6$ затухали (рис.5.9).

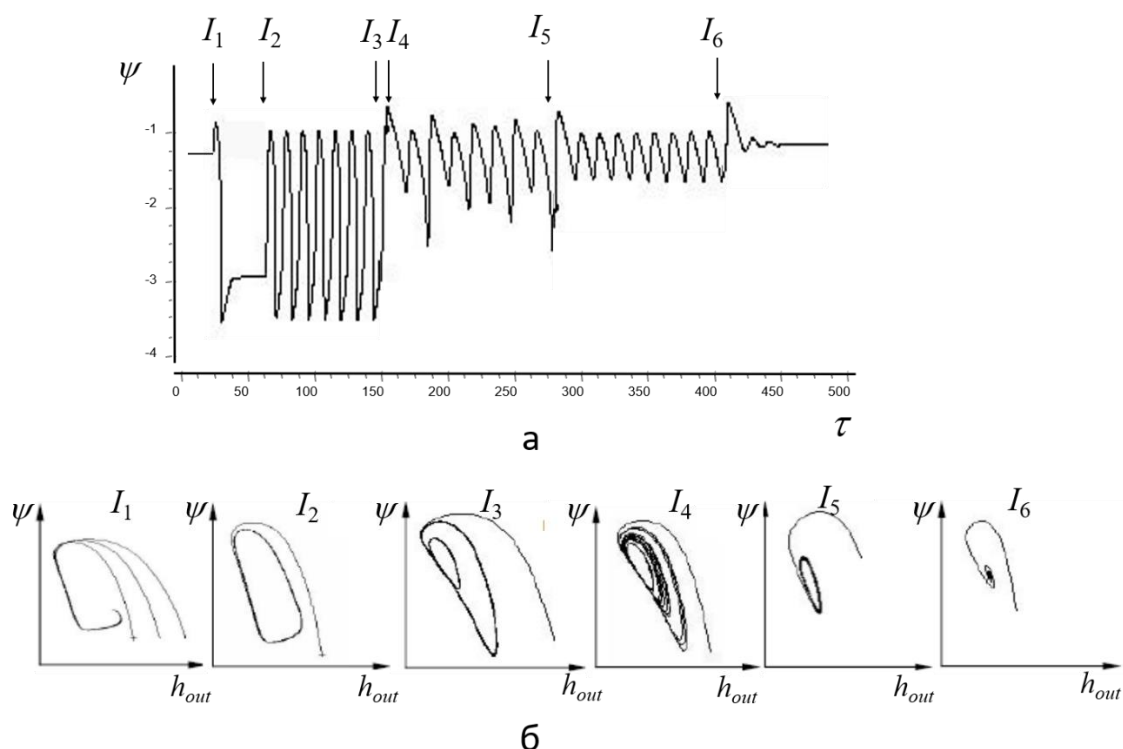


Рисунок 5.9 – Переход к хаотическому режиму при увеличении интенсивности света: а – кинетика переходов; б – фазовые портреты системы. $I_1 = 0$ (устойчивый узел), $I_2 = 0.75$ (предельный цикл), $I_3 = 0.8495$ (удвоение периода колебаний), $I_4 = 0.85$ (странный аттрактор), $I_5 = 2.21$ (предельный цикл), $I_6 = 2.25$ (устойчивый фокус). Параметры модели: $z = 4$, $K_2 = 0.001$, $K_3 = 0.5$, $a = 0.0596$, $b = 0.01$, $m = 1.95$, $\gamma = 0.339$, $g = 1.81$, $\psi_0 = -0.21$, $\alpha = 1$, $\beta = 2.424$.

Далее система (5.6.) была исследована с учетом коэффициентов диффузии и конвекции. Были найдены параметры системы и получены соотношения коэффициентов диффузии, при которых возникали диссипативные структуры, зон рН и потенциала, имеющие нерегулярный характер (рис. 5.9). Учет конвективного члена $B \frac{\partial h_i}{\partial r}$, описывающего циклозис, приводил к тому, что диссипативные структуры возникали, даже при соотношении коэффициентов меньше критического значения, необходимого для возникновения неустойчивости Тьюринга.

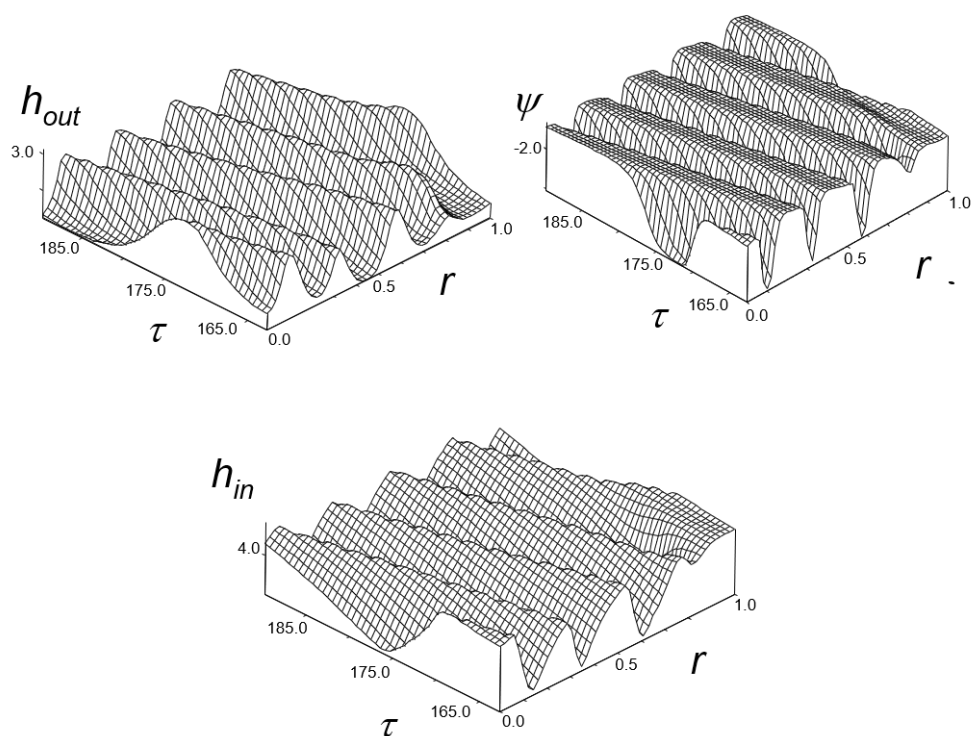


Рисунок 5.9 – Профили pH снаружи клетки, потенциала и pH цитоплазмы в модели модели (5.6). Параметры модели: $K_2 = 0.001$, $g = 1.81$, $K_3 = 0.1$, $\gamma = 0.339$, $\psi_0 = -0.21$, $z = 4$, $a = 0.0596$, $b = 0.01$, $m = 1.678$, $D_1 = 0.0009$, $D_2 = 0.0001$, $D_3 = 0.0009$, $B = 2$, $\alpha = 1$, $\beta = 2.424$.

В модели был воспроизведен эффект, описанный в [Bulychev et al. 2001]: при добавлении в среду цитохалазина (ингибитора циклозиса) структуры (зоны pH и потенциала) исчезали даже на сильном свете. При уменьшении значения параметра B до нуля (ситуация, когда циклозис заингибирован), структуры исчезали, аналогично эффекту, описанному в [Bulychev et al. 2001].

5.5. Механизмы возникновения нелинейных режимов вблизи клеточной мембраны

Разработанная модель позволила сделать некоторые предположения о механизмах потенциалзависимого переноса протонов через АТФазу плазматической мембраны харовых водорослей и оценить его вклад в возникновение неоднородного распределения и колебаний трансмембранного потенциала и pH вблизи мембраны (рис. 5.10).

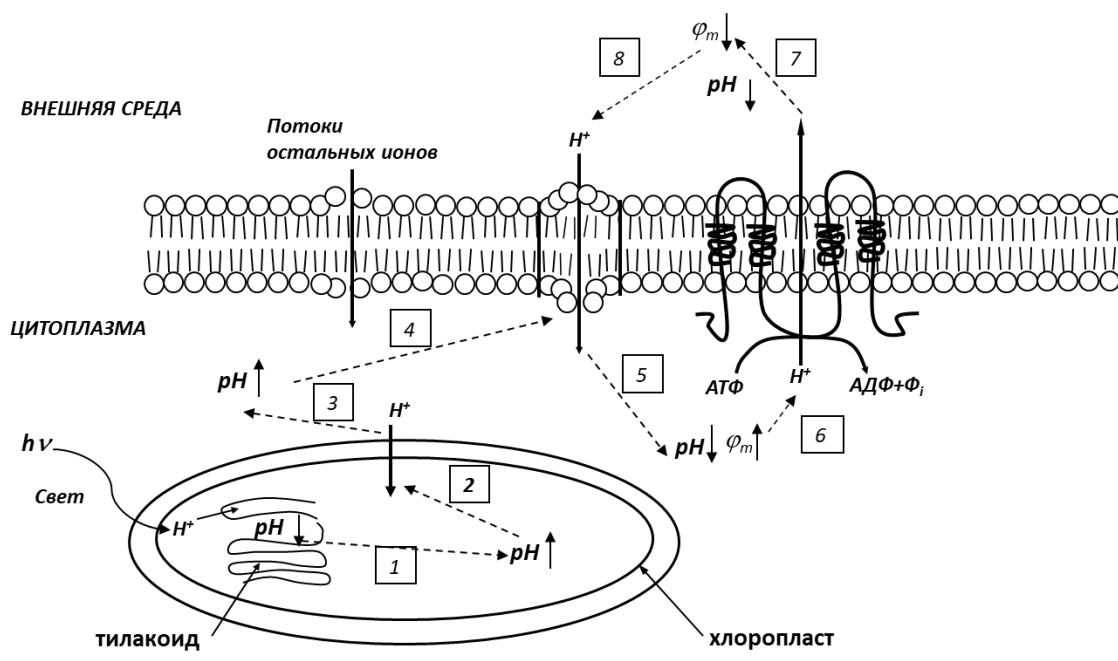


Рисунок 5.10. Схема процессов вблизи мембраны клетки водоросли *Chara corallina*. Пунктирными стрелками обозначена регуляция процессов, φ_m – мембранный потенциал. 1 – Свет инициирует процессы фотосинтеза, рН тилакоида понижается, рН хлоропласта повышается. 2 – Повышение рН внутри хлоропластов инициирует поток протонов из цитоплазмы в хлоропласты. 2 – Поток протонов из цитоплазмы в хлоропласты приводит к повышению рН цитоплазмы и деполяризации мембранного потенциала. 3 – Активация протонных каналов цитоплазматической мембраны. 4 – Увеличение потока протонов через каналы приводит к понижению рН цитоплазмы и деполяризации мембранного потенциала. 5 – Увеличение протонного потока через АТФазу. 6 – Увеличение потока протонов через АТФ-азу приводит к понижению рН снаружи клетки и гиперполяризации мембранного потенциала. 7 – Увеличение потока через протонные каналы. Цикл повторяется (со стадии 5)

Как известно, в результате процессов фотосинтеза, происходит накопление протонов внутри хлоропластов [Jagendorf et al. 1966]. Вследствие этого может происходить защелачивание цитоплазмы [Felle et al. 1986], которое приводит к переходу протонных каналов цитоплазматической мембраны в открытое состояние и, как следствие, к увеличению потока протонов через каналы [Vanselow et al. 1989]. Увеличение пассивного потока протонов внутрь клетки вызывает деполяризацию мембраны и увеличению концентрации протонов внутри клетки. Это, в свою очередь, ведет к увеличению потока протонов через АТФазу, что, наоборот, сопровождается понижением мембранного потенциала (гиперполяризация). Поток через АТФ-азу приводит к повышению концентрации протонов снаружи клетки, которое вызывает ее ингибирование и активацию протонных каналов, и цикл повторяется (рис. 5.10).

Таким образом, световой сигнал вызывает активацию протонных каналов, что в дальнейшем приводит к активации АТФазы. Далее процессы активного и пассивного транспорта взаимно усиливают друг друга, то есть между ними возникает положительная обратная связь, и в системе реализуются колебания потенциала и протонов. Возможно, колебания – это некий переходный процесс, позволяющий живой системе при резком изменении внешних условий перейти в новое состояние не скачкообразно, что могло бы негативно отразиться на физиологических функциях клетки, а постепенно «подстраивая» все параметры к новому состоянию. За счет разнонаправленных протонных потоков через каналы и АТФ-азу могут возникать локальные участки закисления и защелачивания, которые различаются по величине трансмембранного потенциала в примембранной области снаружи клетки. Устойчивые рН зоны образуются за счет различия в коэффициентах диффузии протонов и потенциала между этими участками. Потенциалозависимые АТФ-азы и каналы существуют на мембранах разных типов клеток, поэтому можно предположить, что потенциалозависимое изменение рН является одним из основных регуляторов нелинейной пространственно-временной динамики в примембранной области.

Таким образом, переходный процесс в клетках *Chara corallina* 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.

5.6. Выводы по главе 5

1. Установлено, что при смене светового режима у *Chara corallina* формируются пространственно-временные паттерны на поверхности клетки — чередующиеся кислые и щелочные зоны, сопровождающиеся автоколебаниями трансмембранного потенциала.

2. Обнаружен гистерезис в распределении pH и потенциала, свидетельствующий о наличии памяти в системе и устойчивости к флуктуациям.
3. Построена модель типа «реакция-диффузия», воспроизводящая экспериментальные данные и демонстрирующая условия возникновения диссипативных структур.
4. Показано, что эти режимы выполняют регуляторную функцию.

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 pH и потенциала, свидетельствующий о наличии функциональной памяти в системе.

Результаты главы 5 представлены в работах:

1. Плюснина Т. Ю., Лаврова А. И., Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б. Моделирование неоднородного распределения и колебаний трансмембранного потенциала и pH вблизи внешней стороны мембраны клетки водоросли *Chara corallina* // Биофизика. – 2005. – Т. 50. – № 3. – С. 492–499.
2. Лаврова А. И., Плюснина Т. Ю., Булычев А. А., Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б. Моделирование гистерезиса в распределении pH вблизи мембраны клетки водоросли *Chara corallina* // Биофизика. – 2005. – Т. 50. – № 6. – С. 1088–1094.
3. 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.
4. Plyusnina T. Y., Lavrova A. I., Price C. B., Riznichenko G. Y., Rubin A. B. Nonlinear dynamics near the cell membrane of *Chara corallina* // Journal of Biological Systems. – 2008. – vol. 16. – no. 2. – pp. 197–217.
 5. Плюснина Т. Ю., Лаврова А. И., Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б. Роль протонной АТФ-азы в возникновении нелинейной динамики pH и электрического потенциала на клеточной мембране // Динамические модели процессов в клетках и субклеточных наноструктурах (под ред. Г.Ю. Ризниченко и А.Б. Рубина), (НИЦ Регуляция и хаотическая динамика, Ин-т компьютерных исследований. Москва-Ижевск). – 2010. – С. 264–284.
 6. Лаврова А. И., Плюснина Т. Ю., Украинец А. В., Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б. Нелинейная динамика трансмембранного потенциала и pH в примембранной области клетки харовых водорослей // Компьютерные исследования и моделирование. – 2009. – Т. 1. – № 2. – С. 233–239.
 7. Plusnina T., Lobanov A., Lavrova A., Starozhilova T., Riznichenko G., Rubin A. New spatiotemporal dynamics in a reaction-electrodiffusion model // Biophysics. – 2002. – vol. 47. – no. 2. – pp. 277–282.
 8. Postnikov E. B., Lavrova A. I., Kiseliy R. V., Plyusnina T. Y. 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. – no. 12. – pp. 12502938–12502951.
 9. Bulychev A. A., Polezhaev A. A., Zykov S. V., Plusnina T. Y., Riznichenko G. Y., 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. – no. 3. – pp. 275–294.

Глава 6. Модель переходных процессов в популяции клеток *Chlorella vulgaris* в ответ на действие фосфорного голодания

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 данной главы 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).

Одним из основных факторов стресса, с которым сталкиваются в природе микроводоросли, является недостаток минерального питания. Дефицит таких элементов как азот, фосфор и сера оказывает существенное влияние на состояние клеток, поскольку эти микроэлементы входят в состав белков фотосинтетического аппарата, аминокислот, витаминов и других жизненно важных соединений. В процессе эволюции микроводоросли выработали различные механизмы адаптации, которые позволяют им обитать в природных водах, обедненных биогенными веществами. Исследование этих механизмов является актуальным не только для понимания природы стресса, но и для задач биотехнологии, поскольку в процессе минерального голодания клетки водорослей могут накапливать такие ценные продукты, как углеводы и липиды [Muthuraj et al. 2013, Garay et al. 2014] или вырабатывать водород [Ghirardi et al. 2000, Zhang et al. 2002]. К таким ценным продуктам относятся, в частности, полифосфаты – полимерные соединения из остатков ортофосфорной кислоты, образующиеся в клетках живых организмов и используемые ими в качестве дополнительного источника энергии, поскольку являются макроэргическими

соединениями. Хорошо известно, что клетки микроводорослей и цианобактерий, испытывающие недостаток фосфора, начинают накапливать полифосфаты с повышенной скоростью после вторичного добавления фосфатов в их питательную среду [Sanz-Luque et al. 2020, Solovchenko et al. 2019]. Это свойство в течение уже многих лет вызывает пристальный интерес исследователей, поскольку биомассу водорослей, обогащенных фосфором, можно использовать в качестве фосфорных удобрений для почвы, при этом открываются новые перспективы очистки сточных вод водорослями, поглощающими фосфаты [Solovchenko et al. 2016].

6.1. Модели накопления полифосфата в клетке

Для исследования механизмов накопления полифосфатов был предложен ряд моделей, описывающих динамику накопления полифосфатов клетками микроводорослей в условиях дефицита фосфатов в среде [Singh&Nedbal 2018, John, Flynn 2000, Vijay, Yuan 2017, Carpenter, Bennett 2011]. Эти модели, использующие аппарат дифференциальных уравнений, были построены на основе модели [Droop 1973], описывающей потоки минеральных веществ в клетку, накопление их в клетке в виде клеточного пула и рост культуры. Клеточный пул, накапливаемого минерала, в таких моделях характеризуется максимальной квотой, то есть, максимально возможной концентрацией этого минерала в клетке.

Авторы [John, Flynn 2000] предложили трехкомпонентную модель PIM (phosphate interaction model) накопления фосфата в различных клеточных пулах: пуле полифосфата *PolyP*, пуле растворимого неорганического фосфата (P_i) и пуле органического фосфата (P_o), составляющего структурные компоненты клетки. Рост культуры в модели PIM описывался уравнением экспоненциального роста. В этой работе авторы сравнили динамику накопления фосфатов в модели, содержащей три вышеперечисленных пула с динамикой накопления фосфатов в модели с одним общим пулом фосфатов. Качественно динамика накопления фосфатов в обеих моделях была сходной, однако авторы подчеркивают, для того чтобы разделить процессы ассимиляции и транспорта (важно для организмов,

живущих с прерывным режимом питания), необходимо использовать трехкомпонентную модель. В работе [Singh&Nedbal 2018] трехкомпонентная модель была расширена (exPIM), авторами была введена функция, учитывающая влияние на скорость роста конкуренции клеток за свет. Однако моделирование с помощью расширенной модели exPIM не выявило новых, качественно отличных, режимов по сравнению с режимами модели PIM.

Интересным является экспериментальный факт, показывающий, что в отсутствии голодания (нормальные условия питания), содержание полифосфатов на начальных стадиях роста культуры сначала уменьшается, и только по истечении примерно 2-х дней начинает увеличиваться [Aitchison, Butt 1973], тогда как после периода голодания и последующего восстановления содержания фосфора в среде наблюдается обратная динамика – сначала быстро достигается максимум полифосфата, который затем начинает расходоваться [Aitchison, Butt 1973, Solovchenko et al. 2019]. Это указывает на то, что в зависимости от предыстории наблюдения (голодание или нормальное питание), в клетке могут реализоваться различные механизмы регуляции накопления полифосфатов, приводящие к различной динамике изменения пула полифосфатов в клетке. Выявление таких механизмов является важной задачей математического моделирования, поскольку дает возможность на основе сочетания различных условий роста культуры разрабатывать наиболее оптимальные стратегии накопления полифосфатов.

6.2. Построение модели взаимопревращений пулов фосфатов в клетке

Для построения модели за основу были взяты существующие модели PIM [John, Flynn 2000] и exPIM [Singh, Nedbal 2018], в которых полифосфат синтезируется из неорганического фосфата. Однако с помощью таких моделей удастся описать только возрастающую динамику содержания полифосфата после голодания по фосфору; попытки же описать снижение содержания полифосфата условиях роста культуры на среде с избытком фосфата (экспериментальные данные из [Aitchison, Butt 1973]) оказались безуспешными. Поскольку известно, что в синтезе и гидролизе полифосфата участвуют АТФ и другие

фосфорилированные молекулы, было предположено, что потоки фосфата в клетке следует описывать иначе, чем в указанных выше работах, а именно, нужно учитывать, что полифосфаты синтезируются из органических соединений, содержащих фосфор. Кроме того, было также предположено, что размер минимальных квот пула также может играть роль в наблюдаемой в эксперименте динамике, и включили соответствующие минимальные квоты в уравнения для пулов. Структура модели представлена на рисунке 6.1.

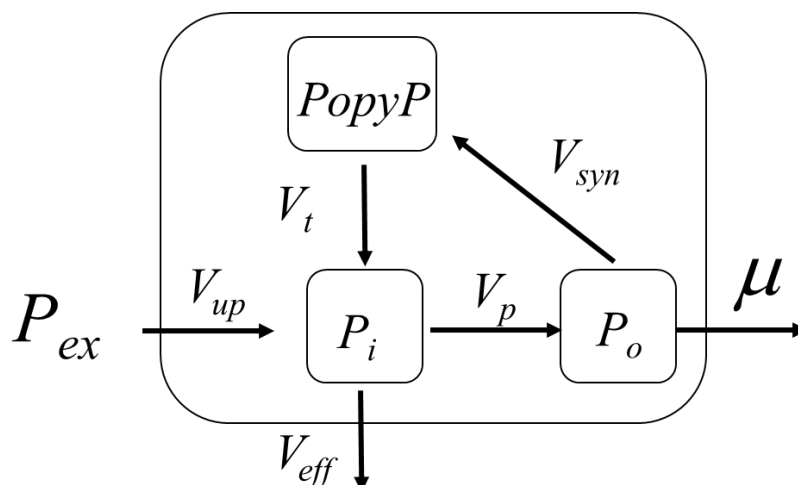


Рисунок 6.1 – Пути преобразования фосфора в клетке водоросли; P_{ex} — неорганический фосфат в среде; P_i — неорганический фосфат в клетке; P_o — органические соединения, содержащие фосфор; $PolyP$ — полифосфат; V_{up} — скорость поглощения фосфата среды клеткой; μ — удельная скорость роста культуры; 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.

Неорганический фосфат P_{ex} из среды поступает в клетку со скоростью V_{up} , пополняя внутриклеточный неорганический пул фосфата P_i . Неорганический фосфат P_i в клетке либо со скоростью V_p включается в пул органических соединений P_o (АТФ, ДНК, РНК, фосфолипиды и т. д.), либо возвращается в среду со скоростью V_{eff} . Часть органического фосфата P_o , в основном в форме АТФ, со скоростью V_{syn} превращается в полифосфаты $PolyP$, которые представляют собой полимер из остатков фосфорной кислоты ($n \cdot PO_4^{3-}$). Другая часть накопленного органического фосфата P_o идет на клеточный рост, который происходит со скоростью μ , (рис. 6.1). Полифосфаты $PolyP$ могут распадаться со скоростью V_t до неорганического фосфата P_i . При выводе уравнений модели необходимо учесть, что в результате увеличения числа клеток содержание

фосфатов во всех пулах в расчете на общее количество клеток в процессе роста уменьшается. Соответствующие уравнения представлены в таблице 6.1.

Таблица 6.1 – Уравнения, описывающие процессы на рисунке 6.1

Процесс	Уравнение	Размерность
Скорость деления клеток	$\frac{dC}{dt} = \mu' \cdot (1 - \frac{C}{K_f}) \cdot C = \mu \cdot C$	$\frac{\text{кЛ}}{\text{мл} \cdot \text{ч}}$ (6.1)
Захват внешнего фосфата P_{ex} клетками	$\frac{dP_{ex}}{dt} = -V_{up} \cdot C \cdot 10^{-10} + V_{eff} \cdot C \cdot 10^{-10}$	$\frac{\text{мкмоль}}{\text{мл} \cdot \text{ч}}$ (6.2)
Изменение внутриклеточного пула P_i	$\frac{dP_i}{dt} = V_{up} - V_p + V_t - V_{eff} - \mu \cdot P_i$	$\frac{\text{мкмоль}}{10^{10} \text{кЛ} \cdot \text{ч}}$ (6.3)
Изменение внутриклеточного пула P_o	$\frac{dP_o}{dt} = V_p - V_{syn} - \mu \cdot P_o$	$\frac{\text{мкмоль}}{10^{10} \text{кЛ} \cdot \text{ч}}$ (6.4)
Изменение внутриклеточного пула $PolyP$	$\frac{dPolyP}{dt} = V_{syn} - V_t - \mu \cdot PolyP$	$\frac{\text{мкмоль}}{10^{10} \text{кЛ} \cdot \text{ч}}$ (6.5)

Рост культуры описывается уравнением логистического роста (6.1, табл. 6.1) – роста с самоограничением, который со временем замедляется даже при достаточном количестве всех питательных веществ, и культура достигает стационарного состояния. Здесь $\mu = \mu'(P_o) \cdot (1 - \frac{C}{K_f})$ – удельная скорость роста культуры (1/ч), которая линейно уменьшается с ростом плотности клеток и зависит от содержания в клетках органических соединений P_o (см. ниже). K_f – емкость среды (максимальное количество клеток в среде, которое достигается в фазе стационарного роста). Такое ограничение роста объясняется самозатенением клеток в плотной культуре, что делает свет ограничивающим фактором для роста культуры [Singh&Nedbal 2018].

Уравнение (6.2) описывает поглощение фосфата P_{ex} из среды. Уравнение (6.3) описывает изменение внутриклеточного пула фосфата P_i , который может увеличиваться за счет поглощения фосфата P_{ex} из среды или за счет гидролиза полифосфата $PolyP$, и уменьшается за счет его включения в органические соединения P_o , оттока из клетки или за счет образования новых клеток (деление клеток). Уравнения (6.4) и (6.5) описывают, соответственно, изменения в пулах P_o и $PolyP$. Для получения конкретного вида выражений в правой части уравнений было предположено, что реакции происходят в соответствии с кинетикой Михаэлиса-Ментен и дополнительно ввели параметры, учитывающие

максимальный и минимальный размер клеточной квоты для пулов фосфатов: $Q_{P_o\max}$, $Q_{P_i\max}$ и $Q_{PolyP\max}$ – максимальные размеры квот и $Q_{P_o\min}$, $Q_{P_i\min}$, $Q_{PolyP\min}$ – минимальные размеры квот для внутриклеточных пулов P_o , P_i и $PolyP$ соответственно. При описании скорости роста μ было учтено, что μ ограничено минимальной клеточной квотой органических соединений P_o : деление клеток прекращается, когда их содержание достигает $Q_{P_o\min}$. Окончательные выражения для соответствующих скоростей представлены в таблице 6.2.

Таблица 6.2 – Выражения для скоростей реакций из таблицы 6.1. Здесь $V_{1,2...7}$ – максимальные скорости; $K_{1,2...7}$ – константы полунасыщения (константы Михаэлиса); $Q_{P_o\max}$, $Q_{P_i\max}$, $Q_{PolyP\max}$ – максимальные квоты для пулов органических фосфорсодержащих соединений P_o , внутриклеточного неорганического фосфата P_i и полифосфата $PolyP$; $Q_{P_o\min}$, $Q_{P_i\min}$, $Q_{PolyP\min}$ – соответствующие минимальные квоты

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

Для численного решения полученной системы ОДУ и идентификации параметров использовался программный пакет DBSolve [Gizzatkulov et al. 2010].

6.3. Экспериментальные данные, используемые для верификации модели

Для верификации решений модели, как правило используют известные экспериментальные данные, описывающие соответствующую динамику. В

большинстве современных работ приводится динамика накопления пула полифосфатов только после голодания [Sanz-Luque et al. 2020, Solovchenko et al. 2019] и не рассматривается динамика накопления фосфатов в нормальных условиях. В связи с этим для верификации предложенной ниже модели были использованы экспериментальные данные из довольно старой работы [Aitchison, Butt 1973], поскольку в этой работе приводились данные одновременно по накоплению и расходованию пулов фосфата и в нормальных условиях, и после голодания. В [Aitchison, Butt 1973] был проведен трехэтапный эксперимент. На начальном этапе (стадия I – рост в нормальных условиях) клетки *Chlorella vulgaris* культивировались в течение 5 дней (120 часов) в среде с избыточным содержанием фосфата (3,23 мМ). Согласно оригинальной статье, к этому времени скорость деления клеток снизилась (культура клеток перешла из экспоненциальной в линейную стадию роста) и затем оставалось постоянной в течение нескольких дней. Авторы показали, что прекращение роста не было связано с истощением фосфата или любого другого питательного вещества в среде. В конце стадии I клетки собирали центрифугированием, ресуспендировали в среде без фосфора и далее в этой среде инкубировали в течение 36 часов (стадия II - голодание). Затем клетки вновь собирали центрифугированием, ресуспендировали в среде с избыточным содержанием фосфата (3,23 мМ) и инкубировали в течение 24 часов (стадия III – добавление фосфатов в среду после голодания). Числовые данные о плотности клеток и содержании полифосфата и ортофосфата в клетках на разных стадиях были представлены в [Aitchison, Butt 1973] и использовались для верификации модели (точки на рисунке 6.2). Данные о кислоторастворимых и кислотонерастворимых фракций полифосфата были объединены. Содержание органических соединений, содержащих фосфор, было оценено путем вычитания содержания ортофосфата и полифосфата из общего содержания фосфата.

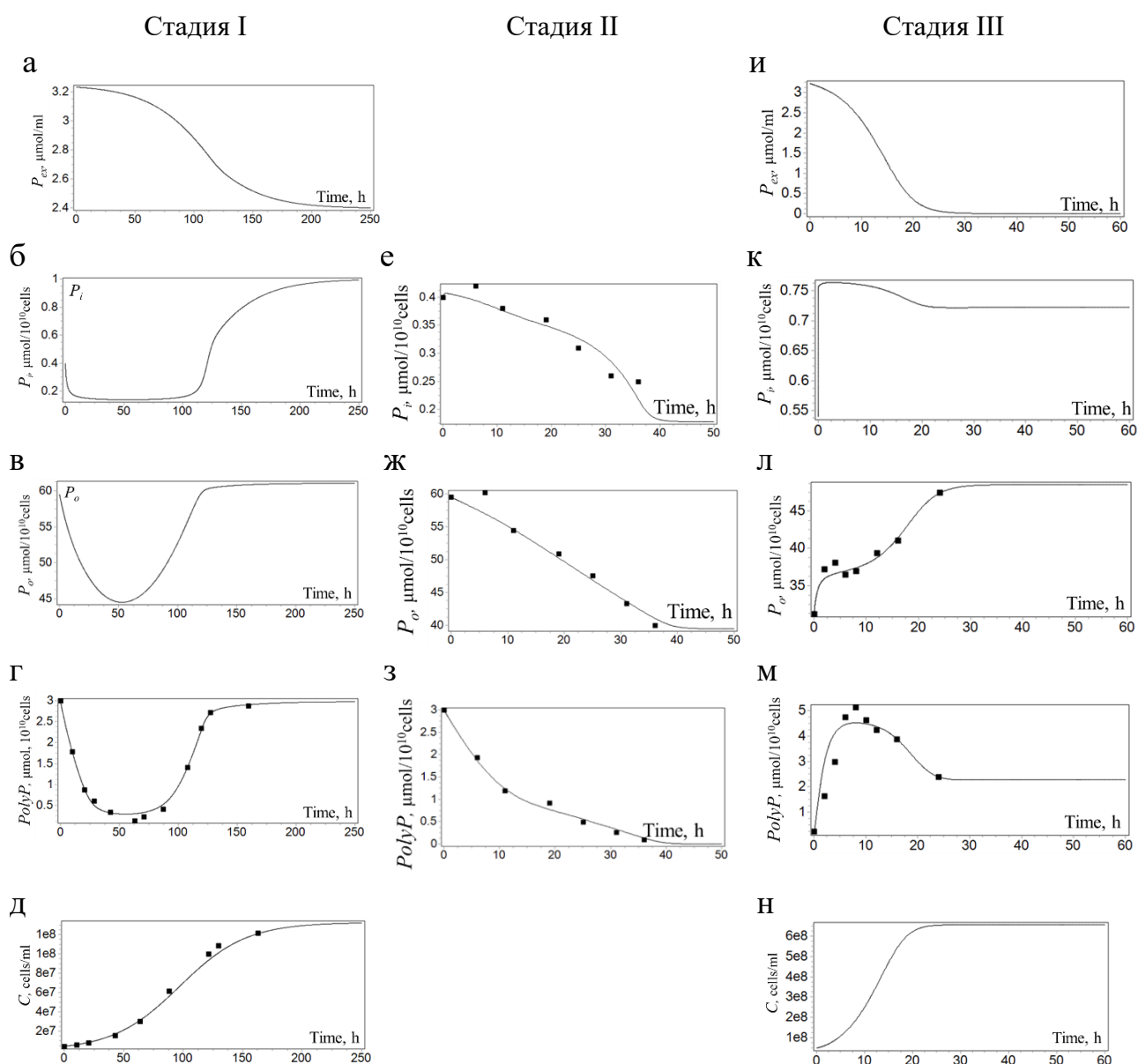


Рисунок 6.2 – Динамика пулов фосфатов и плотности клеток во время роста культуры *Chlorella* в трехстадийном эксперименте: а–д – на среде, с избытком фосфатов, стадия I; е–з – на среде, обедненной фосфатами, стадия II; к–н – при добавлении избытка фосфатов в среду после периода истощения, стадия III. Точки – экспериментальные данные из [Aitchison, Butt 1973], сплошные линии – результаты моделирования. а, и – фосфат среды (P_{ex}); б, е, к – содержание P_i на клетку; в, ж, л – содержание P_o на клетку; г, з, м – содержание $PolyP$ на клетку; д, н – плотность клеток, C .

Идентификация параметров модели проводилась для каждой из описанных выше стадий эксперимента: стадия I – культивирование в среде с избытком фосфата, стадия II – инкубация в среде без фосфора, стадия III – рост после добавления фосфата в голодающую культуру.

В качестве начальных значений переменных выбирались значения из [Aitchison, Butt 1973] в соответствии с тремя типами условий роста. Начальные

значения переменных и значения параметров модели приведены в таблицах 6.3 и 6.4, соответственно.

Таблица 6.3 – Начальные значения переменных модели

	Стадия I	Стадия II	Стадия III
$C \left(\frac{\text{КЛ}}{\text{МЛ} \cdot \text{ч}} \right)$	$4 \cdot 10^6$	$1.3 \cdot 10^8$	$1.3 \cdot 10^8$
$P_{ex} \left(\frac{\text{МКМОЛЬ}}{\text{МЛ}} \right)$	3.23	0	3.23
$P_i \left(\frac{\text{МКМОЛЬ}}{10^{10} \text{ КЛ}} \right)$	0.4	0.34	0.54
$P_o \left(\frac{\text{МКМОЛЬ}}{10^{10} \text{ КЛ}} \right)$	59.5	59.5	31.2
$PolyP \left(\frac{\text{МКМОЛЬ}}{10^{10} \text{ КЛ}} \right)$	3	3	0.1

Таблица 6.4 – Параметры модели, полученные при аппроксимации экспериментальных данных.

	Стадия I	Стадия II	Стадия III
K_1	0.12		703.52
K_2	0.00		780.11
K_3	0.19	120.93	135.51
K_5	123.50	1.81	1.04
K_6	0.08	0.16	0.01
K_7	0.01	0.01	0.01
K_f	$1.32 \cdot 10^8$		$6.29 \cdot 10^8$
V_1	1.54		25267.31
V_2	0.04		29.30
V_3	100.04	404.85	5582.12
V_5	7.89	1.99	5.68
V_6	1.11	2.14	38.26
V_7	100.02	0.62	0.27
Q_p	61.85		60.41
Q_{pi}	1.00		0.71
Q_{pp}	9.13		20.04
Q_p	30.00	38.67	32.02

Все кривые, относящиеся к одной стадии, описываются одним набором параметров модели, соответствующим этой стадии. Результаты численных экспериментов приведены на рисунке 6.2.

6.4. Динамика пулов фосфатов в клетках *Chlorella* в различных условиях роста

С помощью разработанной модели экспериментальная динамика отдельных пулов фосфата была дополнена модельными кривыми для других

пулов, что позволило получить целостную картину превращения пулов фосфата на разных стадиях.

Стадия I эксперимента [Aitchison, Butt 1973] начинается с культивирования клеток, взятых из стационарной культуры с высоким содержанием *PolyP*, в среде с избытком фосфата клеток *Chlorella*. Для этой стадии экспериментально измерены были изменения плотности клеток C и внутриклеточного содержания *PolyP* (рис. 6.2 д, г), эти данные использовались для идентификации параметров модели. Полученный набор параметров был использован для воспроизведения динамики остальных переменных модели: фосфата среды P_{ex} , неорганического P_i и органического P_o фосфата в клетке (рис. 6.2 а, б, в). До 50-го часа культивирования все три внутриклеточных пула – P_o , P_i и *PolyP* в расчете на клетку уменьшаются. После 50-го часа пул органического фосфата P_o начинает увеличиваться, и к 110-му часу достигает насыщения. Пул полифосфатов *PolyP* также увеличивается и достигает насыщения, но с задержкой $\sim$ на 10 часов (время, необходимое для синтеза полифосфатов из органического фосфата). К 110-му часу рост культуры замедляется, культура переходит в стационарную фазу роста, а внутриклеточный пул P_i начинает резко увеличиваться, поскольку уже не расходуется в пулы P_o и *PolyP*, которые к этому времени достигли значений своих максимальных квот и не могут больше расти. Через 200 часов культивирования, когда скорость роста культуры существенно снижается и выходит на плато, фосфат среды P_{ex} уменьшается почти в полтора раза от своего начального значения, скорость поглощения фосфата среды становится незначительной, а все внутриклеточные пулы фосфатов достигают своих стационарных уровней.

На **стадии II** водоросли были перенесены в среду без фосфора [Aitchison, Butt 1973]. Для этой стадии экспериментально получены были кривые внутриклеточного содержания P_i , P_o и *PolyP*. При аппроксимации решениями модели (рис. 6.2 е, ж, з) учитывалось, что для этой стадии скорость поглощения фосфатов среды $V_{up} = 0$, и удельная скорость роста культуры $\mu = 0$. Как видно из экспериментальных и модельных кривых, на этой стадии все пулы фосфатов

истощаются до своих минимальных значений (минимальных квот) за 40 часов в результате оттока P_i в среду.

На **стадии III** после голодания клетки ресуспендировали в среде, богатой фосфором, с тем же содержанием фосфата, как и на стадии I [Aitchison, Butt 1973]. Для этой стадии экспериментально были измерены кинетики внутриклеточного содержания P_o и $PolyP$ (рис. 6.2 л, м). Для найденного при аппроксимации набора параметров модели была получена динамика остальных переменных модели – фосфата среды P_{ex} , содержания P_i на клетку и плотности клеток C (рис. 6.2 и, к, н). После добавления фосфата в среду наблюдаются довольно быстрый рост клеточных пулов фосфата в течение первых 24 часов и быстрый, к 30-му часу, выход на стационар (в сравнении выходом на стационар к 110 часу роста культуры на стадии I, при изначальном избытке фосфатов в среде). За это время практически весь фосфат P_{ex} среды поглощается клетками (рис. 6.2 и). Рост культуры сначала характеризуется лаг-фазой, а затем культура достигает стационарного состояния (рис. 6.2 н). Пул P_i довольно быстро увеличивается с 0,54 до 0,76 мкмоль 10^{-10} клеток $^{-1}$, затем начинает немного уменьшаться (рис. 6.2 и). Пул $PolyP$ в первые 10 часов увеличивается почти в 2 раза по сравнению с его значением до голодания на стадии I, но в течение следующих 10 часов он снова уменьшается (рис. 6.2 м). Пул органического фосфата P_o также увеличивается в этот период и затем остается на стационарном уровне (рис. 6.2 л).

Таким образом, учет превращения пула органического фосфата P_o в пул полифосфата $PolyP$, введение минимальных и максимальных квот пулов и описание роста культуры с учетом самоограничения позволило воспроизвести динамику экспериментов [Aitchison, Butt 1973] на всех стадиях. Нужно подчеркнуть, что существующие модели [Singh, Nedbal 2018, John, Flynn 2000, Vijay, Yuan 2017, Carpenter, Bennett 2011] позволяют описать только стадию III – интенсивный рост фосфатных пулов после добавления фосфатов в среду к голодающей культуре. При этом во всех моделях, и в рассматриваемой в данном разделе в том числе, рост культуры после добавления фосфатов к голодающей

культуре имеет лаг-фазу, то есть, начинается с экспоненциальной фазы роста. Такая кинетика наблюдается, например, в экспериментах [Solovchenko et al. 2019]. Однако в работе [Aitchison, Butt 1973], экспериментальные данные которой мы использовали для идентификации параметров модели, были неявные указания на то, что на стадии III рост культуры был незначительным, то есть, рост культуры, возможно, начинался со стационарной фазы. Анализируя модель, мы обнаружили, что описать динамику пула *PolyP* на стадии III (быстрый рост пула, достижение пика и последующее уменьшение) можно только в случае интенсивного роста культуры (при наличии экспоненциальной фазы роста) в результате чего фосфат среды истощается. Однако, как было указано в [Aitchison, Butt 1973], фосфат в среде был в избытке, а рост культуры был незначительным, что с большой вероятностью и указывает на стационарную фазу роста.

6.5. Модификация модели с учетом регуляции образования полифосфатов

Для объяснения возникновения пика полифосфатов *PolyP* после добавления фосфатов к голодающей культуре в стационарной фазе роста было предположено, что существует механизм регуляции активности ферментов, участвующих в метаболизме полифосфатов, либо на уровне их синтеза, либо на уровне гидролиза (без такого предположения при найденных параметрах культура на стадии III всегда находилась в экспоненциальной фазе роста). Синтез *PolyP* регулируется полифосфаткиназой (Vtc-комплекс), и согласно данным протеомики по экспрессии Vtc-комплекса [Solovchenko et al. 2019] он мог бы являться ключевым ферментом, определяющим динамику *PolyP*. Однако попытки описать динамику *PolyP* для III стадии эксперимента [Aitchison, Butt 1973] в условиях стационарной фазы роста культуры за счет учета разных механизмов работы Vtc-комплекса оказались безуспешными. Далее было предположено, что ключевым этапом метаболизма *PolyP* является гидролиз пула *PolyP*, регулируемый неким фактором R , концентрация которого зависит от уровня неорганического фосфата клетки P_i . Основываясь на наблюдаемой динамике пула *PolyP*, было предположено, что R активирует гидролиз *PolyP*. R

достигает своего максимума при достаточном количестве внешнего фосфата, и, следовательно, скорость гидролиза $PolyP$ также может достигать своего максимума. Во время голодания уровень P_i снижается, также снижается и уровень R , что приводит к блокировке гидролиза пула $PolyP$. Восполнение фосфата после голодания вызывает медленный подъем уровня R , тем самым приводя к разблокировке гидролиза $PolyP$. Для моделирования описанной динамики R было введено уравнение

$$\frac{dR}{dt} = \frac{V_R \cdot (P_i - Q_{P_i \min})^n}{(P_i - Q_{P_i \min})^n + K_R^n} \frac{Q_{R \max} - R}{Q_{R \max}} - k \cdot R, \quad (6.6)$$

в котором образование R зависит от кооперативного связывания P_i в форме Хилла–Ленгмюра с коэффициентом Хилла n , и учитывает минимальную квоту Q_{minP_i} неорганического фосфата клетки P_i , а также максимальную квоту регулятора R , Q_{maxR} . Распад регулятора пропорционален его концентрации с константой скорости k . Было предположено, что скорость гидролиза $PolyP$ пропорциональна R/Q_{maxR} , поэтому выражение для V_t из таблицы 6.2 преобразовалось в следующее: $V_t = \frac{V_6 \cdot (PolyP - Q_{PolyP \min})}{PolyP - Q_{PolyP \min} + K_6} \cdot \frac{Q_{P_i \max} - P_i}{Q_{P_i \max}} \cdot R/Q_{R \max}$. В

результате аппроксимации экспериментальных данных решениями модели удалось получить единый набор параметров (табл. 6.5), при котором адекватно описывается динамика пулов фосфатов для всех 3-х стадий эксперимента [Aitchison, Butt 1973] в предположении, что культура на стадии III эксперимента находится в стационарной фазе роста (рис. 6.3 а). Назовем эксперимент, в котором на стадии III культура находится в экспоненциальной фазе роста – сценарием 1, а эксперимент, в котором на стадии III культура находится в стационарной фазе роста – сценарием 2. Таким образом, исходная модель описывает эксперименты для сценария 1, а модель с модификацией, учитывающей регуляцию гидролиза пула $PolyP$ – эксперименты для сценария 2. В сценарии 2 динамика пулов фосфатов на стадии I эксперимента близка к таковой для сценария 1. Это объясняется тем, что уровень R практически

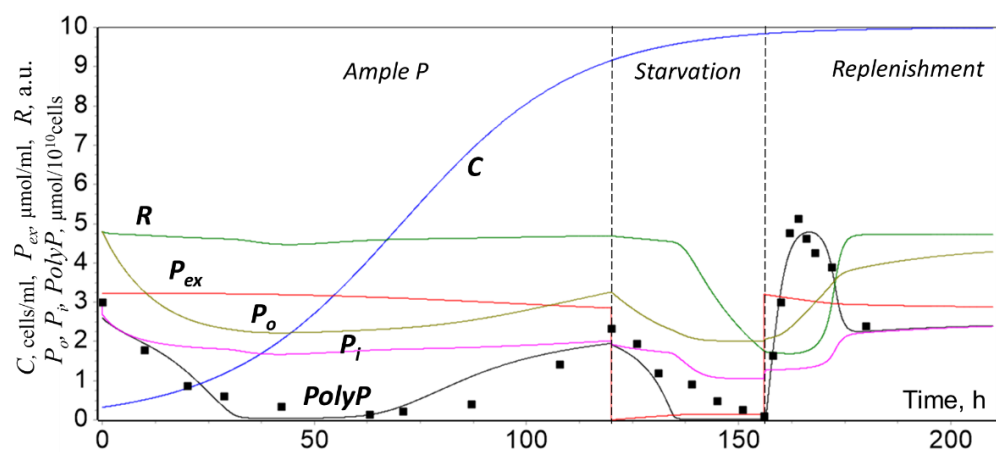
постоянен (рис.6.3 а, зеленая кривая), поскольку фосфат среды P_{ex} на этой стадии находится в избытке.

Таблица 6.5 – Параметры модифицированной модели, полученные при аппроксимации экспериментальных данных

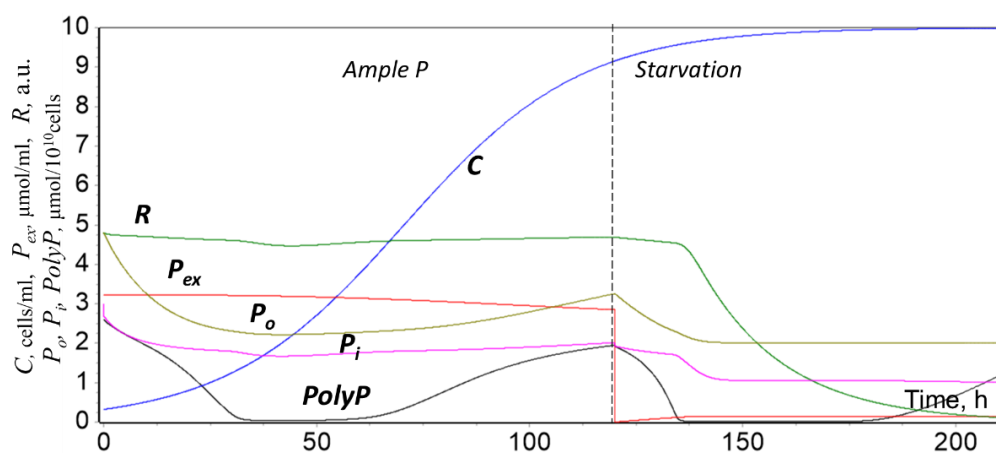
K1	74.84
K3	0.19
K5	1.69
K6	0.00
K7	0.52
Kf	1.25E+08
KmR	0.07
V1	44.00
V2	0.05
V3	81.51
V5	26.18
V6	22.23
V7	5.53
VR	0.05
kR	0.05

Как следствие, решения исходной и модифицированной моделей качественно совпадают.

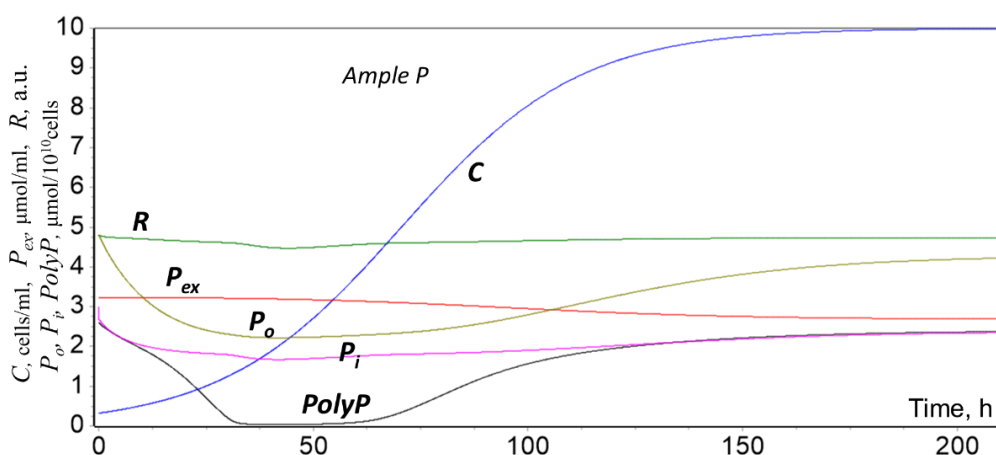
Через 120 часов роста культуры (стадия II эксперимента) при ее переносе на среду без фосфора ($P_{ex} = 0$) происходит постепенное уменьшение всех клеточных пулов фосфата. Уменьшение пула P_i приводит к тому, что уровень регулятора R тоже начинает снижаться, поскольку зависит от P_i (уравнение 6.6). Уменьшение концентрации R в свою очередь приводит к значительному снижению скорости гидролиза полифосфатов V_l . (при этом скорость синтеза полифосфатов V_{syn} меняется незначительно. В результате на следующей стадии III в ответ на добавление P_{ex} происходит быстрое накопление $PolyP$ (скорость его синтеза значительно превышает скорость гидролиза). Далее начинает работать обратная связь. Пул P_i начинает увеличиваться, поскольку фосфат в среде вновь в избытке. Увеличение P_i вызывает увеличение R , что в конечном итоге приводит к увеличению скорости гидролиза синтезированного с избытком $PolyP$.



a



б



в

Рисунок 6.3 – Динамика пулов фосфатов, содержания регулятора и плотности клеток в процессе роста культуры хлореллы на трех экспериментальных стадиях: а – трехэтапный эксперимент, в котором клетки выращивали в среде, богатой фосфором, в течение 120 ч, затем переносили в среду, обедненную фосфором, и после 36 ч голодания в среду добавляли избыток фосфата; б – модельный эксперимент, в котором на стадии III, вместо добавления фосфата в среду, блокировали реакцию гидролиза; в – модельный эксперимент, в котором не было стадии голодания, и уровень внешнего фосфата поддерживался в избытке в течение всего периода роста культуры.

Таким образом, динамика *PolyP* на стадии III эксперимента демонстрирует отчетливый пик с последующим снижением до стационарного уровня. Без добавления внешнего фосфата P_{ex} блокада гидролиза *PolyP* ($V_t = 0$) не приводит к его накоплению (рис. 6.3 б), так как пул органического фосфата P_o истощен, и, соответственно, нет субстрата для синтеза *PolyP*. Если фосфата среды P_{ex} достаточно в течение всего периода эксперимента, пик *PolyP* также не наблюдается, поскольку уровень регулятора R практически не меняется (рис. 6.3 в).

6.5.1. Влияние продолжительности фосфатного голодания

Модифицированная модель позволила объяснить и другие эффекты, описанные в [Aitchison, Butt 1973]. Так было указано, что продолжительность периода голодания по фосфору (продолжительность стадии II) влияет на величину пика *PolyP* на стадии III – чем короче период голодания, тем слабее выражен пик *PolyP* после добавления в среду фосфата. В модельных экспериментах мы обнаружили, что при сокращении продолжительности голодания (стадии II) с 36 до 30 часов, пик *PolyP* значительно уменьшается (рис. 6.4, синяя кривая), а при уменьшении до 20 часов практически исчезает (рис. 6.4, черная кривая).

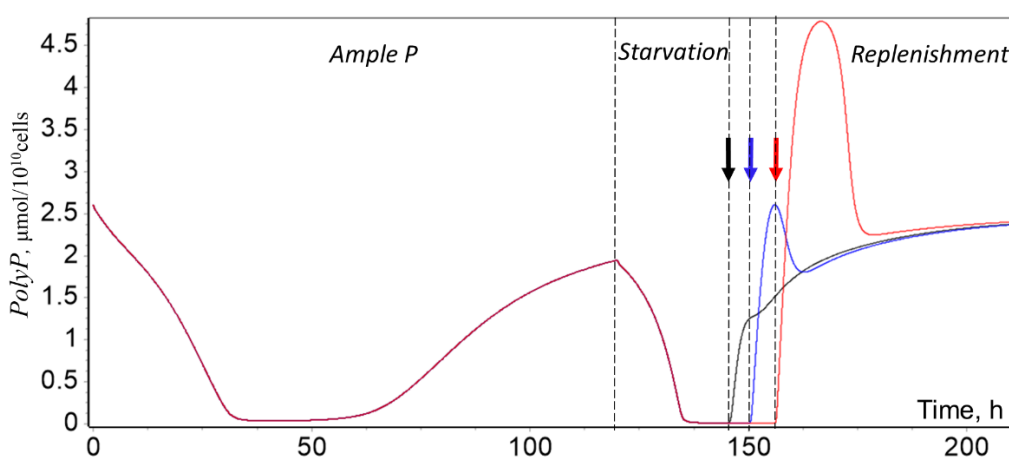


Рисунок 6.4 – Динамика пула полифосфатов *PolyP* во время роста культуры *Chlorella* в трехэтапном эксперименте; клетки выращивали в среде, богатой фосфором, в течение 120 часов (стадия I), затем переносили в среду, обедненную фосфором (пунктирная линия) (стадия II). После голодания избыток фосфата добавляли в среду (стадия III) через 20 часов (черная кривая и черная стрелка), 30 часов (синяя кривая и синяя стрелка) или 36 часов (красная кривая и красная стрелка).

Авторы [Aitchison, Butt 1973] также указывают на то, что с увеличением продолжительности голодания увеличивается и скорость поглощения фосфата V_{up} . С помощью модели была воспроизведена динамика V_{up} для разной продолжительности голодания (рис. 6.5). Увеличение продолжительности от 0 до 20 часов приводит к соответствующему увеличению максимальной скорости поглощения V_{up} , дальнейшее увеличение продолжительности голодания не изменяет величину максимальной V_{up} .

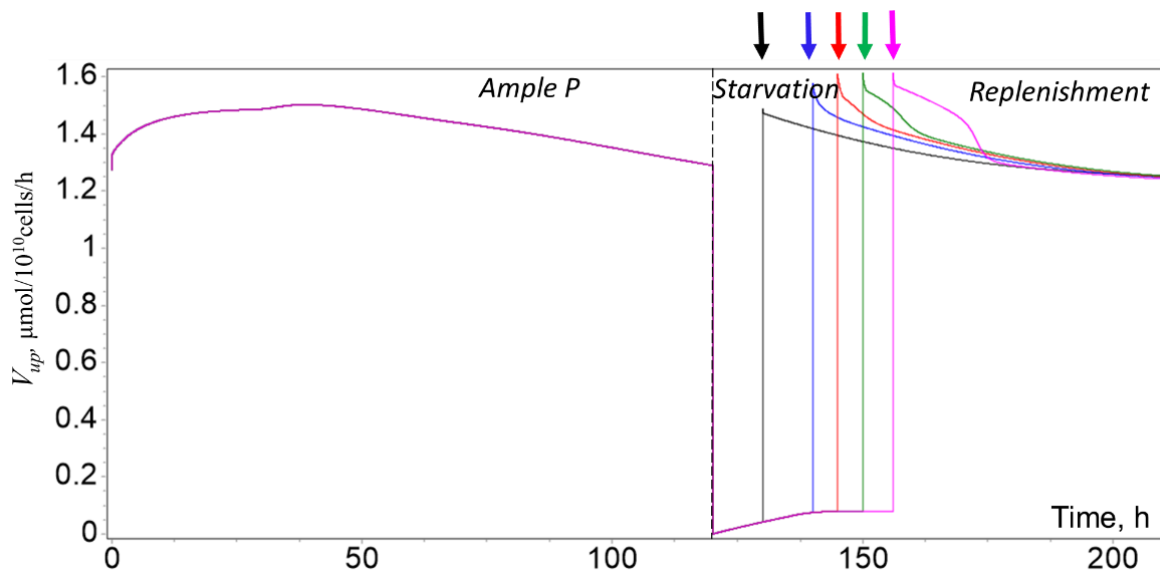


Рисунок 6.5 – Динамика скорости поглощения фосфата V_{up} во время роста культуры *Chlorella* в трехэтапном эксперименте. Клетки выращивали в среде, богатой фосфором, в течение 120 часов (стадия I), затем переносили в среду, обедненную фосфором (пунктирная линия) (стадия II). После голодания избыток фосфата добавляли в среду (стадия III) через 5 часов (черная кривая и черная стрелка), 20 часов (синяя кривая и синяя стрелка), 24 часа (красная кривая и красная стрелка), 30 часов (зеленая кривая и зеленая стрелка) или 36 часов (пурпурная кривая и пурпурная стрелка).

Анализируя результаты модельных экспериментов на рисунках 6.4 и 6.5, можно заключить, что пик *PolyP* на стадии III эксперимента возникает не за счет увеличения скорости поглощения фосфата среды V_{up} , поскольку после 20 голодания на стадии II скорость V_{up} на стадии III уже достигает своего максимального значения, а за счет регуляции реакции гидролиза, причем, чем короче период голодания, тем в меньшей степени осуществляется регуляция, поскольку пул P_i не успевает сильно истощиться и концентрация регулятора R , зависящая от P_i , меняется незначительно.

6.5.2. Условия максимального выхода $PolyP$

Для биотехнологических задач важно найти условия, при которых достигается максимальный выход $PolyP$ в культуре (обозначим его как $PolyP_{tot}$). Количество $PolyP_{tot}$ в культуре можно рассчитать как произведение плотности клеток C и содержания $PolyP$ на клетку: $PolyP_{tot} = C \cdot PolyP$. Две версии модели, соответствующие двум сценариям трехстадийного эксперимента, позволяют описать и два различных сценария накопления $PolyP$ на стадии III (рис. 6.6). Сценарий 1 описывает интенсивный рост культуры клеток (экспоненциальная фаза роста) на стадии III эксперимента. В этом сценарии $PolyP$ и $PolyP_{tot}$ достигают своих максимальных значений в разное время: соответственно через 8 и 16 часов после добавления фосфата к голодающей на стадии II культуре, при этом культура достигает своей стационарной плотности примерно через 30 часов после добавления фосфата (рис. 6.6 а), а фосфат среды P_{ex} истощается. Сценарий 2 описывает культуру с низкой скоростью деления (стационарной фазе роста), поэтому плотность клеток остается практически постоянной, а фосфат среды P_{ex} остается в избытке. В этом сценарии $PolyP$ и $PolyP_{tot}$ достигают максимальных значений одновременно: примерно через 8 часов после добавления фосфата (рис. 6.6 б).

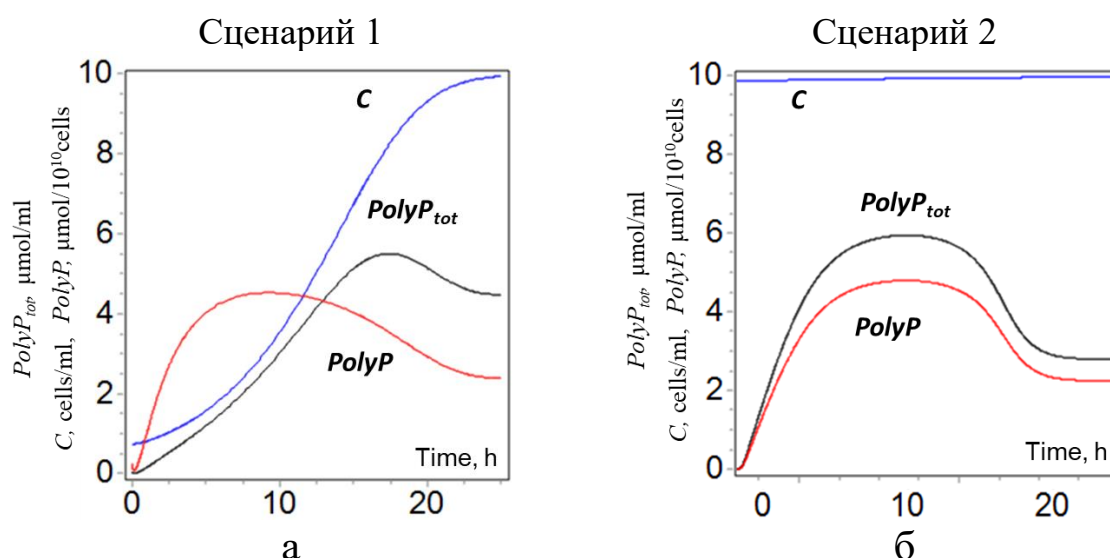


Рисунок 6.6 – Динамика $PolyP$ и $PolyP_{tot}$ в культуре клеток микроводорослей: а – сценарий 1, интенсивно растущая культура, фосфат среды P_{ex} истощается; б – сценарий 2, культура в стационарной фазе, фосфат среды P_{ex} в избытке. Красные кривые – содержание полифосфата ($PolyP$) на клетку, черные кривые – общее содержание полифосфата ($PolyP_{tot} \cdot 10^{-8}$), синие кривые – плотность клеток ($C \cdot 10^{-7}$).

6.6. Механизмы адаптации клеток *Chorella* к фосфорному голоданию

Несмотря на повышенный интерес к проблеме накопления полифосфатов в клетках водорослей, точный механизм регуляции этого процесса до сих пор неясен. Накопление *PolyP* после внесения фосфата в голодающую культуру может происходить по двум разным сценариям. В первом случае фосфат добавляется в культуру, находящуюся в экспоненциальной фазе роста, как, например, в [Solovchenko et al. 2019], затем культура начинает достаточно интенсивно расти и за короткое время достигает стационарной фазы. За это время фосфат среды практически полностью истощается, а замедление роста клеток сопровождается пиком *PolyP* (**Сценарий 1**). В другом случае фосфат вносится в культуру в стационарной фазе роста [Aitchison, Butt 1973], концентрация фосфата среды практически не меняется, количество клеток увеличивается незначительно, однако пик *PolyP* в клетках также наблюдается (**Сценарий 2**). Было предложено два варианта модели, в которых реализуются два сценария накопления *PolyP*, описанные выше. Согласно этим вариантам, можно предложить два механизма накопления *PolyP*.

Для **Сценария 1** регуляция в явном виде в модель не вводилась, различия в кинетике *PolyP* удалось описать, используя три разных набора значений параметров модели для трех стадий эксперимента. Здесь неявная регуляция обеспечивается изменением параметров реакций. Так, константа Михаэлиса в выражении для скорости синтеза полифосфатов V_{syn} на стадии III на два порядка меньше по сравнению с ее значением для стадии I, что соответствует значительному увеличению скорости синтеза *PolyP* и объясняет различия в кинетике *PolyP* на стадиях I и III при одинаковом уровне фосфата среды (рис. 6.2). Можно предположить, что регуляторный механизм в сценарии 1 связан с экспрессией полифосфаткиназы (Vtc-комплекса), которая, как было показано в [Solovchenko et al. 2019], усиливается после голодания по фосфору (стадии II), что и приводит к активации синтеза *PolyP*. После повышения уровня P_i в клетке и устранения состояния голодания экспрессия Vtc-комплекса вновь снижается, и уровень *PolyP* также начинает снижаться.

Для описания **Сценария 2** недостаточно изменить только параметры модели. Анализ возможных регуляций реакций синтеза и гидролиза *PolyP* показал, что именно учет регуляции гидролиза *PolyP* позволяет описать динамику всех переменных в этом случае. В реакцию гидролиза *PolyP* был введен регулятор R , чувствительный к уровню неорганического фосфата в клетке P_i , являющемуся продуктом гидролиза. Из анализа экспериментальной кинетики фосфатных пулов в клетке [Aitchison, Butt 1973] было предположено, что этот регулятор действует в первую очередь на гидролиз *PolyP*, регулируя деградацию *PolyP*. В условиях избыточного содержания фосфата в среде (в отсутствии голодания) содержание фосфата в клеточных пулах находится в динамическом равновесии (P_i переходит в P_o , P_o переходит в *PolyP*, *PolyP* распадается до P_i). Когда P_i уменьшается в результате голодания, уровень регулятора R соответственно тоже уменьшается. Это является причиной того, что после добавления фосфата в среду равновесие этих пулов нарушается, поскольку скорость гидролиза V_i полифосфатов *PolyP* значительно снижается по сравнению со скоростью их синтеза V_{syn} . Таким образом, большая часть поглощенного фосфата переходит в пул *PolyP* (на кривой отражается как пик *PolyP*), в следствие этого уровень P_i некоторое время остается довольно низким (рис 6.3 а, пурпурная кривая), хотя уровень фосфата среды P_{ex} высок. Таким образом, даже при наличии избытка фосфата в среде некоторое время клетка остается в состоянии дефицита P_i , как при голодании. Клетка может выйти из этого состояния только тогда, когда пул *PolyP* заполнится (приблизится к максимальной квоте), и дальнейший синтез *PolyP* прекратится. После заполнения пула *PolyP* пулы P_o и P_i тоже начинают пополняться (рис 6.3 а, светло-зеленая и пурпурная кривые соответственно). Уровень регулятора R , зависящий от P_i , начинает повышаться, это приводит к тому, что скорость гидролиза V_i полифосфатов начинает превышать скорость их синтеза V_{syn} , вследствие чего пул *PolyP* уменьшается, и фосфатный обмен возвращается к исходному равновесию. Такая последовательность событий свидетельствует, по-видимому, о наличии положительной обратной связи: уменьшение P_i приводит к уменьшению R , что

приводит к снижению скорости гидролиза V_i и дальнейшему снижению P_i . (как продукта гидролиза $PolyP$). Скорость поглощения фосфата из среды V_{up} при этом уже достигла максимума (как следует из рисунка 6.5) и не влияет на динамику пула P_i . Таким образом, если R уменьшается ниже некоторого критического уровня, фосфатный обмен клетки переключается на альтернативный режим, переориентируясь на запасание $PolyP$.

Имеет место явление гистерезиса – существование двух режимов фосфатного обмена, выбор между которыми определяется предысторией развития культуры клеток. Это объясняет зависимость появления пика $PolyP$ от периода голодания: при кратковременном голодании фосфорный обмен не успевает переключиться в режим накопления $PolyP$ (рис. 6.4).

Регуляция ферментов, связанных с внутриклеточным содержанием фосфата в различных организмах, была изучена во многих работах: [Slocombe et al. 2020, Solovchenko et al. 2019, Andreeva et al. 2015, Austin, Mayer 2020, Lavrinovics et al. 2021]. Наиболее распространенное описание механизма такой регуляции включает наличие SPX-доменов (участков белков), присутствующие в ферментах, связанных с транспортом фосфата через внешнюю и внутреннюю мембраны клетки [Ried et al. 2021]. SPX-домены связывают высокофосфорилированные формы инозитола (инозитолпирофосфаты IP7 и IP8), которые синтезируются в клетке при избытке фосфата и гидролизуются в формы с меньшим количеством фосфатных групп при дефиците фосфата [Cridland, Gillaspay 2020, Austin, Mayer 2020]. Таким образом, можно предположить, что инозитолпирофосфат является регулятором, участвующим в описанных выше механизмах пикового накопления $PolyP$ после стадии голодания.

Кроме описанных выше двух сценариев накопления полифосфатов $PolyP$ с помощью моделирования модель позволяет прояснить механизмы, определяющие динамику $PolyP$ и в не голодающей культуре (**стадия I**). Как показано в экспериментах [Aitchison, Butt 1973], в активно растущей культуре при наличии избытка фосфата в среде накопления $PolyP$ не происходит, напротив, кривые демонстрируют спад $PolyP$ (рис. 6.2 г). Весь поглощенный

клеткой фосфат расходуется на синтез органического фосфата P_o , необходимого для роста культуры. Если в эксперименте в качестве инокулята использовать клетки, находящиеся в стационарной фазе роста и имеющие запас $PolyP$, то этот запас расходуется на рост клеток в течение первых суток культивирования (рис. 6.2 г). Накопление $PolyP$ начинается, когда рост клеток ограничен, например, из-за их самозатенения, а внешний фосфат остается в избытке. По мере замедления роста культуры количество $PolyP$ в клетках увеличивается. В результате, когда рост культуры достигает стационарной фазы, клетка накапливает определенное количество $PolyP$.

6.7. Применение в биотехнологии: накопление $PolyP$ в биомассе клеток и очистка сточных вод

Важнейшими задачами биотехнологии является разработка методов, которые бы с одной стороны обеспечивали максимальное накопление полифосфатов $PolyP$ в культурах клеток для последующего использования их в качестве удобрений, а с другой стороны – максимальное удаление фосфатов из окружающей среды, способствуя очищению водоемов. Однако ни один из рассмотренных выше сценариев не позволяет одновременно решить обе поставленные задачи. Так в **Сценарии 2** максимум $PolyP$ в культуре достигается ~ за 8 ч (по сравнению с 16 ч достижения максимума $PolyP$ в культуре в **Сценарии 1**) после добавления фосфата к голодающей культуре (рис. 6.6), но истощения среды в не происходит, поскольку культура находится в стационарной фазе роста. В **Сценарии 1** культура, находящаяся в экспоненциальной фазе роста активно поглощает фосфат среды, что приводит к тому, что к ~ 30-му часу роста, фосфата в среде практически не остается, но к этому времени пул полифосфата значительно сокращается. Таким образом, культура, голодающая в фазе стационарного роста, накапливает $PolyP$ быстрее, чем растущая культура в фазе экспоненциального роста; однако такую культуру нельзя использовать для очистки сточных вод, так как при таком сценарии фосфат среды практически не потребляется. Как видно, задачи накопления биомассы с максимальным содержанием $PolyP$ и обеспечения оптимальной степени очистки сточных вод

являются взаимоисключающими. Для получения суммарного результата можно предложить двухэтапную стратегию культивирования водорослей. **Первый этап – максимальное накопление PolyP.** В емкость со сточными водами помещают водоросли, голодающие по фосфору, в таком количестве, чтобы плотность полученной суспензии соответствовала плотности культуры в стационарной фазе роста. Водоросли следует предварительно инкубировать в среде, не содержащей фосфора, в течение необходимого времени (36 ч для штамма, использованного в [Aitchison, Butt 1973]). Начинается активное накопление фосфатов клетками, вследствие чего содержание именно полифосфатов в культуре становится максимальным (через 8 ч для исследуемого штамма), при этом другие клеточные пулы фосфатов заполнены не полностью. После максимального накопления полифосфата в культуре клеток биомассу следует собрать, получив при этом ценные фосфорные удобрения. **Второй этап – очистка воды.** Далее в эту же емкость следует вновь поместить голодающую культуру, но уже в таком количестве, чтобы плотность полученной суспензии соответствовала плотности культуры в экспоненциальной фазе роста. Такая культура начнет активно поглощать фосфаты среды, ее следует оставить расти до тех пор, пока фосфор в емкости не иссякнет. Биомасса, полученная на этом этапе, представляет собой менее ценное удобрение, поскольку распределение фосфатов в клеточных пулах уже не обеспечивает максимального содержания полифосфатов. Основным результатом второго этапа является очистка воды в резервуаре от фосфатов. После очистки воды культуру можно выдержать в голодном состоянии необходимое время (36 ч для этого штамма) и далее поместить биомассу с соответствующей плотностью в новый резервуар со сточными водами, после чего вновь начнется этап накопления полифосфатов. Далее этапы повторяются. Таким образом, реализация такой двухэтапной стратегии позволит сначала получить биомассу, наилучшим образом пригодную для использования в качестве удобрения, а затем эффективно очистить сточные воды от избытка фосфатов.

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.

6.8. Выводы по главе 6

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.

Результаты главы 6 представлены в работе:

Plyusnina T. Y., Khrushev S. S., Fursova P. V., Solovchenko A. E., Antal T. K., Riznichenko G. Y., 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. – no. 12. – pp. 3571-3585.

Обсуждение результатов

Представленная работа посвящена исследованию динамической организации переходных процессов в клетках фотосинтезирующих организмов как регуляторных фаз адаптации к изменению внешних условий. Ключевым положением работы является тезис о том, что переходные процессы представляют собой направленные иерархически организованные динамические перестройки, обеспечивающие сохранение важных для фотосинтезирующей клетки функций клетки при действии стрессовых факторов.

Основной методологический подход стало сочетание количественного анализа экспериментальных наблюдений и математического моделирования в рамках системного подхода. Особое внимание уделялось выявлению и использованию временной иерархии процессов от пико- и миллисекундных реакций в фотосистеме II до часов и дней, необходимых для метаболических реакций и роста популяции клеток. Эта иерархия легла в основу стратегии редукции сложных кинетических моделей, позволяющей свести многомерные системы к системам с небольшим числом ключевых переменных, сохраняя при этом связь эффективных параметров с элементарными константами через аналитические выражения. Такая «редукция с разворачиванием» обеспечивает решение обратной задачи кинетического моделирования, поиска эффективных параметров по экспериментальным кривым, не теряя возможности интерпретации элементарных процессов.

В главе 1 была дана теоретическая основа исследования: показана необходимость перехода от описания стационарных состояний к анализу переходных режимов как функционально значимых этапов адаптации. Фотосистема II (ФСII) была выбрана в качестве модельной системы благодаря большому количеству информации, касающейся ее строения и функционирования, а также доступности методов быстрой регистрации в лабораторных экспериментах кривых индукции флуоресценции хлорофилла *a*, форма которых отражает переходы между состояниями ФСII. Основным выводом главы стало утверждение о том, что нелинейная динамика переходных

процессов сама по себе служит индикатором начала адаптации задолго до появления макроскопических признаков повреждения или изменения роста.

Глава 2 посвящена разработке и верификации редуцированных кинетических моделей ФСII и метода спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации (СМЭА). Была предложена модель ФСII, основанная на группировке состояний по числу электронов на хинонных акцепторах (один, два, три), что позволило получить аналитическое решение в виде суммы трех экспоненциальных функций и сопоставить фазы индукционной кривой (OJ, J, IP) с конкретными этапами переноса электрона для клеток водорослей и высших растений. Ключевым результатом стало установление явной связи эффективных параметров модели с элементарными константами скоростей световых и безызлучательных переходов. С помощью модели были выявлены существенные различия в динамике переходов в ФСII в клетках водорослей и высших растений, что указывает на ограничения традиционного JIP-теста, привязанного исключительно к временным точкам индукционной кривой.

Для анализа гетерогенности реакционных центров ФСII при действии DCMU была построена модель из 24 состояний, которую в результате редукции удалось свести к двум уравнениям и получить аналитическое решение как сумму двух экспоненциальных функций. Полученное аналитическое решение позволило дать корректную интерпретацию сигмоидности начального участка индукционной кривой. Показано, что такая сигмоидность обусловлена вкладом отрицательной экспоненциальной функции, соответствующей реакциям в кислород-выделяющем комплексе (КВК), тогда как в литературе распространено мнение, что сигмоидность реализуется в связности реакционных центров ФСII. На основе этой модели была сформулирована комбинированная модель для оценки гетерогенности ФСII, а именно оценки долей α - и β -центров, отличающихся размером светособирающей антенны и оценки долей реакционных центров с неактивными КВК. Модель использовалась далее для количественной оценки изменения гетерогенности в различных условиях стресса.

Метод СМЭА был реализован как инструмент детектирования фаз индукционных кривых, в том числе визуально не обнаруживаемых. Аппроксимация кривой суммой экспонент с фиксированными характерными временами на логарифмической сетке позволила преобразовать временные профили в спектральные «полосы», где цвет сопоставляется временной шкале, а высота – амплитуде фазы, а представление индукционных кривых в виде таблокарт дает возможность визуализировать большие массивы данных, получаемых, например, при мониторинге.

Глава 3 продемонстрировала применение разработанных методов к анализу действия стрессовых факторов: азотного голодания, токсикантов и изменения светового режима у *Chlorella vulgaris*. Было показано, что переходные процессы в ФСII возникают значительно раньше видимых макроскопических изменений. Например, при истощении азота в среде на ~30 ч роста культуры наблюдались резкие скачки амплитуд фаз OJ и JI по СМЭА, совпадающие по времени с истощением внешнего азота, тогда как внутриклеточные запасы еще не были исчерпаны. Визуализация полученного массива данных в процессе роста культуры в биореакторе в виде теплокарт продемонстрировала высокую чувствительность метода к ранним изменениям в функциональном состоянии ФСII, в частности, к появлению К-фазы (~0,15–0,25 мс), отражающей нарушение работы КВК еще до снижения показателя активности ФСII – F_v/F_m .

Анализ с помощью редуцированной модели выявил одновременное снижение доли α -центров и в большей степени доли центров с активным КВК, что указывает на комплексную перестройку фотосинтетического аппарата: сначала кратковременное усиление электронного транспорта (адаптивная реакция), затем его угнетение и рост гетерогенности. Аналогично, при воздействии Cd^{2+} и $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ доминирующим эффектом оказалось угнетение КВК, тогда как антенный комплекс оставался практически неизменным. Особый интерес представляет анализ межвидовой вариабельности: при увеличении интенсивности света у пяти видов водорослей наблюдались противоположные тенденции в изменении доли α -центров и активности КВК. Это свидетельствует

о том, что даже у таксономически близких организмов стратегии адаптации могут довольно сильно различаться, что требует осторожной экстраполяции выводов с одного модельного объекта на другой.

Глава 4 посвящена разработке кинетической и потоковой моделей для описания перехода культуры клеток *Chlamydomonas reinhardtii* в режим выделения водорода при серном голодании. Ключевым результатом стало установление механизма триггерного переключения, обусловленного нелинейной динамикой двойного протонирования первичного хинона Q_AH_2 . При этом вторичный хинон (PQH_2) выступает в роли медленно меняющегося управляющего параметра, который, достигнув критического уровня, запускает бифуркацию в подсистеме более быстрых переменных (концентрация протонов в строме). Модель воспроизводит три фазы: I – постепенное накопление PQH_2 (часы), II – скачкообразное переключение (10–20 мин), III – состояние с инактивированной ФСII (часы). Потоковая модель центрального метаболизма в совокупности с реакциями электронного транспорта в фотосинтетической и дыхательной цепях показала, что перераспределение потоков происходит последовательно в разных метаболических путях: сначала снижение активности Рубиско и запуск хлородыхания (48 ч), затем переход от анаболических реакций (синтез крахмала) к катаболическим (гликолиз), с максимумом выделения H_2 на 72 часу роста. Сопряжение кинетической и потоковой моделей через общие параметры (PQH_2 , $NAD(P)H$) позволило рассматривать наблюдаемые переходы как иерархически организованные процессы, где медленные метаболические перестройки управляют быстрыми фотохимическими переключениями.

В главе 5 рассматривается иерархическая взаимосвязь процессов переноса протонов через клеточную мембрану гигантской клетки *Chara corallina* потенциалозависимым транспортером H^+ -АТФазой с диффузией протонов и потенциала вдоль мембраны. Здесь переходные процессы проявляются как пространственно-временные паттерны: автоколебания мембранного потенциала и чередующиеся кислые и щелочные зоны вдоль поверхности клетки. Построенная модель типа «реакция-диффузия» объединила данные о

каталитическом цикле H^+ -АТФазы, ионных каналах, кабельных свойствах мембраны и диффузии протонов. Численный анализ показал возможность субкритической бифуркации Андронова–Хопфа (жесткое возбуждение автоколебаний) и бифуркации Тьюринга (образование диссипативных структур). Экспериментально обнаруженный гистерезис в зависимости ΔpH от интенсивности света был воспроизведен в модели и объяснен наличием двух устойчивых режимов: гомогенное распределение ΔpH и структуры вдоль мембраны. Таким образом, переходный процесс в *Chara* представлен как интегрированный ответ, обусловленный взаимодействием процессов фотосинтеза, трансмембранного протонного переноса и латеральной диффузии и является еще одним примером многоуровневой организации адаптации.

В главе 6 добавляется новый иерархический уровень, популяционный, рассматриваются процессы в культуре *Chlorella vulgaris* при комбинированных режимах фосфорного голодания и избытка фосфатов в среде, в частности оптимизацию накопления полифосфатов PolyP, являющимися ценными удобрениями. Построенная модель связала внутриклеточные пулы фосфата (P_i , PolyP, P_o) с ростом культуры и синтезом PolyP. Было установлено, что накопление PolyP начинается на ранней стадии стресса, до остановки роста, и обусловлено петлей положительной обратной связи: снижение неорганического фосфата P_i приводит к снижению регулятора R, что вызывает снижение скорости гидролиза PolyP и приводит к еще большему снижению P_i . Модель предсказывает пороговый эффект: пик PolyP достигается только при достаточной длительности голодания (~30 ч), что легло в основу предложенной двухэтапной биотехнологической стратегии очистки сточных вод с одновременным получением биоудобрений.

Заключение

В данной 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 α -центров и активности КВК; под действием токсикантов (соли Cd^{2+} и $Cr_2O_7^{2-}$) 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 (Q_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 *Poly*.

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 литературы

1. Aitchison P.A., Butt V.S. The Relation between the Synthesis of Inorganic Polyphosphate and Phosphate Uptake by *Chlorella vulgaris*. // J. Exp. Bot. – 1973. – vol. 24. pp. 497–510. – doi:10.1093/jxb/24.3.497.
2. Allakhverdiev S, Kreslavski V, Klimov V, Los D, Carpentier R, Mohanty P Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. // Photosynth Res. – 2008. – vol. 98. – pp. 541–550. – doi.org/10.1007/s11120-008-9331-0.
3. Anderson J.M. and Melis A. Localization of different photosystems in separate regions of chloroplast membranes. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1983. – vol. 80. – no 3. – pp. 745–749. – doi: 10.1073/pnas.80.3.745.
4. Andreeva, N., Trilisenko, L., Eldarov, M., Kulakovskaya, T. Polyphosphatase PPN1 of *Saccharomyces cerevisiae*: Switching of Exopolyphosphatase and Endopolyphosphatase Activities. // PLoS ONE. – 2015. – vol. 10 – e0119594. – doi:10.1371/journal.pone.0119594.
5. Antal T. K., Krendeleva T. E., Laurinavichene T. V., Makarova V. V., Ghirardi M. L., Rubin A. B., Tsygankov A. A., Seibert M. The Dependence of Algal H₂ Production on Photosystem II and O₂ Consumption Activities in Sulfur-Deprived *Chlamydomonas reinhardtii* Cells // Biochim. Biophys. Acta. – 2003. – pp. 1607 153–160.
6. Antal T. K., Matorin D. N., Kukarskikh G. P., Lambreva M. D., Tyystjärvi E., Krendeleva T. E., Tsygankov A. A., Rubin A. B. Pathways of hydrogen photoproduction by immobilized *Chlamydomonas reinhardtii* cells deprived of sulfur. // International journal of hydrogen energy. – 2014. – vol. 39. – pp. 18194 – 18203.
7. 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 – no. 3. – pp. 476-486.
8. Antal T., Mattila H., Hakala-Yatkin M., Tyystjärvi T., and Tyystjärvi E. Acclimation of photosynthesis to nitrogen deficiency in *Phaseolus vulgaris*. // Planta. – 2010. – vol. 232 – no. 4. – pp. 887–898. DOI: 10.1007/s00425-010-1227-5.
9. Antal T., Rubin A. In vivo analysis of chlorophyll *a* fluorescence induction. // Photosynth Res. – 2008. – vol. 96. – pp. 217–226.

10. Antal T.K., Krendeleva T.E., Rubin A.B. Acclimation of Green Algae to Sulfur Deficiency: Underlying Mechanisms and Application for Hydrogen Production // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 89. P. 3–15.
11. Antal T.K., Krendeleva T.E., Rubin A.B. Study of Photosystem 2 Heterogeneity in the Sulfur Deficient Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* // Photosynth Res. – 2007. – vol. 94. – pp. 13–22.
12. Antal T.K., Maslakov A.S., Yakovleva O.V. et al. Simulation of chlorophyll fluorescence rise and decay kinetics, and P700 - related absorbance changes by using a rule-based kinetic Monte-Carlo method // Photosyn. Res. – 2018. – vol. 138. – no. 2. – pp. 191-206.
13. 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. – no. 3. – pp. 476-486.
14. Austin S., Mayer A. Phosphate Homeostasis – A Vital Metabolic Equilibrium Maintained Through the INPHORS Signaling Pathway. // Front. Microbiol. – 2020. – vol. 11. – 1367. – doi:10.3389/fmicb.2020.01367.
15. Baake E., Schloder J.P. Modelling the Fast Fluorescence Rise of Photosynthesis // Bull. Math. Biol. – 1992. – vol. 54. – pp. 999–1021.
16. Belyaeva N.E., Bulychev A.A., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. A Model of Photosystem II for the Analysis of Fast Fluorescence Rise in Plant Leaves. // Biophysics. – 2011. – vol. 56. – no. 3. – pp. 464–477. – DOI: 10.1134/S0006350911030055.
17. Belyaeva N.E., Bulychev A.A., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. Analyzing both the fast and the slow phases of chlorophyll a fluorescence and P700 absorbance changes in dark-adapted and preilluminated pea leaves using a Thylakoid Membrane model // Photosynth. Res. – 2019. – vol. 140. – pp. 1–19.
18. Belyaeva N.E., Bulychev A.A., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. Thylakoid membrane model of the Chl a fluorescence transient and P700 induction kinetics in plant leaves // Photosynth. Res. – 2016. – vol. 130. – pp. 491–515.
19. Belyaeva N.E., Schmitt F.-J., Paschenko V.Z., Riznichenko G.Y., Chemeris Y.K., Renger G., Rubin A.B. PSII model-based simulations of single turnover flash-induced transients of fluorescence yield monitored within the

- time domain of 100 ns - 10 s on dark-adapted *Chlorella pyrenoidosa* cells // Photosyn. Res. – 2008. – vol. 98. – pp. 105-119.
20. Belyaeva N.E., Schmitt F.-J., Paschenko V.Z., Riznichenko G.Y., Rubin A.B., Renger G. Model based analysis of transient fluorescence yield induced by actinic laser flashes in spinach leaves and cells of green algae *Chlorella pyrenoidosa* Chick // Plant Physiology and biochemistry. – 2014. – vol. 77. – pp. 49-59.
 21. Belyaeva N.E., Schmitt F.-J., Paschenko V.Z., Riznichenko G.Yu, Renger G., Rubin A.B. PS II model based analysis of transient fluorescence yield measured on whole leaves of *Arabidopsis thaliana* after excitation with light flashes of different energies // BioSystems. – 2011. – vol. 103. – pp. 188–195.
 22. Bennoun P. Evidence for a Respiratory Chain in the Chloroplast // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1982. – vol. 79. – pp. 4352–4356.
 23. Bulychev A.A., Cherkashin A.A., Rubin A.B. *et al.* Distribution of Acid and Alkaline Zones on the Cell Surface of *Chara corallina* under Stationary and Local Illumination. // Russian Journal of Plant Physiology. – 2002. – vol. 49. – pp. 715–722 – <https://doi.org/10.1023/A:1020950324700>
 24. Bulychev 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. – no. 3. – pp. 275–294.
 25. Bulychev A.A., Strelets T.S. Oscillations of chlorophyll fluorescence after plasma membrane excitation in *Chara* originate from nonuniform composition of signaling metabolites in the streaming cytoplasm. // Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics. – 2024. – vol. 1865. pp. 1-10.
 26. Bulychev A.A., Zykov S.V., Rubin, A.B. Muller S.C. Transitions from alkaline spots to regular bands during pH pattern formation at the plasmalemma of *Chara* cells. // Eur Biophys J. – 2003. – vol. 32. – pp. 144–153. <https://doi.org/10.1007/s00249-003-0280-4>
 27. Bulychev A.A., Krupenina N.A. Role of membrane H⁺ transport and plasmalemma excitability in pattern formation, long-distance transport and photosynthesis of characean algae в журнале // Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. – 2024. – vol. 18. – no 3. – pp. 188-199.

28. Carpenter S.R., Bennett E.M. Reconsideration of the Planetary Boundary for Phosphorus. // Environ. Res. Lett. – 2011. – vol. 6. – pp. 014009. doi:10.1088/1748-9326/6/1/014009.
29. Cetner M. D., Kalaji H. M., Goltsev V., Aleksandrov V., Kowalczyk K., Borucki W., Jajoo A. Effects of nitrogen-deficiency on efficiency of light-harvesting apparatus in radish. // Plant Physiology and Biochemistry. – 2017. – vol. 119. – pp. 81–92. DOI: 10.1016/j.plaphy.2017.08.016.
30. Chang K.W., Tang H., Fu L.J., Xia Q., Pan Z.Y., Tan J.L., Lysenko V., Guo Y. Recent advances in plant stress analysis using chlorophyll *a* fluorescence. // Photosynthetica. – 2025. – vol. 63. – no. 4. – pp. 359-373. doi: 10.32615/ps.2025.037.
31. Chemeris Yu.K., Shenderova L.V., Venediktov P.S., Rubin A.B. Activation of Chlororespiration Increases Chlorophyll Fluorescence Yield in *Chlorella* Adapted to Darkness at High Temperature // Biol. Bull. – 2004. – vol. 31. – pp. 143–150.
32. Chen, L.-H., Xu, M., Cheng, Z., Yang, L.-T. Effects of Nitrogen Deficiency on the Photosynthesis, Chlorophyll *a* Fluorescence, Antioxidant System, and Sulfur Compounds in *Oryza sativa*. // Int. J. Mol. Sci. – 2024. – vol. 25. – p. 10409. –DOI: 10.3390/ijms251910409.
33. Chernev P., Goltsev V., Zaharieva I., Strasser R.J. A highly restricted model approach quantifying structural and functional parameters of Photosystem II probed by the chlorophyll *a* fluorescence rise // Ecological Engineering and Environment protection. – 2006. – vol. 5. – pp. 19-29.
34. Cournac L., Josse E., Josse T., Rumeau D., Redding K., Kuntz M., Peltier G. Flexibility in Photosynthetic Electron Transport: A Newly Identified Chloroplast Oxidase Involved in Chlororespiration // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. – 2000. – vol. 355. – pp. 1447–1454.
35. Covert MW, Schilling CH, Palsson B. Regulation of gene expression in flux balance models of metabolism. // J Theor Biol. 2001. – vol. 213. – pp. 73–88.
36. Covert, M.W., Xiao, N., Chen, T.J., Karr, J.R., 2008. Integrating metabolic, transcriptional regulatory and signal transduction models in *Escherichia coli*. // Bioinformatics. – 2008. – vol. 24. – pp. 2044-2050.
37. Cridland C., Gillaspay G. Inositol Pyrophosphate Pathways and Mechanisms: What Can We Learn from Plants? // Molecules. – 2020. – vol. 25. – p. 2789. doi:10.3390/molecules25122789.

38. Crofts A.R., Wraight C.A. The electrochemical domain of photosynthesis // Biochim. Biophys. Acta. – 1983. – vol. 726. – pp. 149–185.
39. Cruz S., Goss R., Wilhelm C., Leegood R., Horton P., Jakob T. Impact of Chlororespiration on Non-Photochemical Quenching of Chlorophyll Fluorescence and on the Regulation of the Diadinoxanthin Cycle in the Diatom *Thalassiosira pseudonana* // J. Exp. Bot. – 2011. – vol. 62. – pp. 509–519.
40. Dao L.H.T., Beardall J. Effects of lead on two green microalgae *Chlorella* and *Scenedesmus*: photosystem II activity and heterogeneity. // Algal Res. 2016. – vol. 16. – pp. 150–159. DOI: 10.1016/j.algal.2016.03.006.
41. de Marchin T., Ghysels B., Nicolay S., Franck F. Analysis of PSII antenna size heterogeneity of *Chlamydomonas reinhardtii* during state transitions. // Biochim. Biophys. Acta. – 2014. – vol. 1837. – no. 1. – pp. 121–130. – DOI: 10.1016/j.bbabi.2013.07.009.
42. 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). Natural Computing Series. Springer, Berlin, Heidelberg. – 2004. – pp. 59–103. 2,59 п.л. https://doi.org/10.1007/978-3-642-18734-6_4.
43. Droop, M.R. Some thoughts on nutrient limitation in algae. // J. Phycol. – 1973. – vol. 9. 264–272. doi:10.1111/j.1529-8817.1973.tb04092.x.
44. Ebenhof O, Houwaart T, Lokstein H, Schlede S, Tirok K. A minimal mathematical model of nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence. // Biosystems. – 2011. – vol. 103. – pp. 196–204.
45. Edwards J.S., Covert M., and Palsson B. Metabolic modelling of microbes: the flux-balance approach. Environ. // Microbiol. – 2002. – vol. 4. – pp. 133–140.
46. Fagioni M., D'Amici G.M., Timperio A.M., Zolla L. Proteomic Analysis of Multiprotein Complexes in the Thylakoid Membrane upon Cadmium Treatment. // Journal of Proteome Research. – 2009. – vol. 8. – no. 1. – pp. 310–326. – DOI: 10.1021/pr800507x.
47. Faller P., Kienzler K., Krieger-Liszkay A. Mechanism of Cd²⁺ toxicity: Cd²⁺ inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca²⁺ site. // Biochimica et Biophysica Acta. – 2005. – vol. 1706. – pp. 158–164. – DOI:10.1016/j.bbabi.2004.10.005.

48. Forestier M., King P., Zhang L., Posewitz M., Schwarzer S., Happe T., Ghirardi M.L., Seibert M. Expression of two [Fe]-hydrogenases in *Chlamydomonas reinhardtii* under anaerobic conditions. // Eur J Biochem. – 2003. – vol. 270 – pp. 2750–2758.
49. Garay, L.A. Boundy-Mills, K.L. German, J.B. Accumulation of High-value Lipids in Single-cell Microorganisms: A Mechanistic Approach and Future Perspectives. // J. Agric. Food Chem. – 2014. – vol. 62. – pp. 2709–2727. doi:10.1021/jf4042134.
50. Ghirardi M.L., Zhang L., Lee J.W., Flynn T., Seibert M., Greenbaum E., Melis A. Microalgae: A Green Source of Renewable H₂. // Trends Biotechnol. – 2000. – vol. 18. – pp. 506–511. – doi:10.1016/S0167-7799(00)01511-0.
51. Gibasiewicz K., Dobek A., Breton J., Leibl W. Modulation of Primary Radical Pair Kinetics and Energetics in Photosystem II by the Redox State of the Quinone Electron Acceptor QA // Biophys. J. – 2001. – vol. 80. – pp. 1617–1630.
52. Gizzatkulov N.M., Goryanin I.I., Metelkin E.A., Mogilevskaya E.A., Peskov K.V., Demin O.V. DBSolve Optimum: a software package for kinetic modeling which allows dynamic visualization of simulation results. // BMC Syst Biol. – 2010. – vol. 4. – no 1. – pp. 109. – DOI: 10.1186/1752-0509-4-109.
53. Goltsev V., Yordanov I. Mathematical model of prompt and delayed chlorophyll fluorescence induction kinetics // Photosynthetica. – 1997. – vol. 33. – no. 3. – pp. 571-586.
54. Govindjee, Papageorgiou G. Chlorophyll A Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. // Advances in Photosynthesis and Respiration, Springer 2004. 10.1007/978-1-4020-3218-9.
55. Guenther J.E., Melis A. The Physiological Significance of Photosystem II Heterogeneity in Chloroplasts // Photosynth. Res. – 1990. – vol. 23. – pp. 105–109.
56. Gupta R. The oxygen-evolving complex: a super catalyst for life on earth, in response to abiotic stresses. // Plant Signaling & Behavior. – 2020. – vol.15. – no. 12. – pp. 1824721. – DOI:10.1080/15592324.2020.1824721.
57. Hamilton M. L., Franco E., Deák Z., Schlodder, E., Vass I., Nixon P. J. Investigating the Photoprotective Role of Cytochrome b-559 in Photosystem II in a Mutant with Altered Ligation of the Haem. // Plant and Cell

- Physiology, 2014. – vol. 55. – no. 7. – pp. 1276–1285. – DOI: 10.1093/pcp/pcu070.
58. Hayat S., Khalique G., Irfan M., Wani A.S., Tripathi B.N., Ahmad A. Physiological changes induced by chromium stress in plants: an overview. // Protoplasma. – 2012. – vol. 249. – pp. 599–611. – DOI: 10.1007/s00709-011-0331-0.
 59. Henrysson T., Sundby C. Characterization of photosystem II in stroma thylakoid membranes. // Photosynthesis Research, – 1990. – vol. 25. – no. 2. 107–117 (). DOI: 10.1007/bf00035459.
 60. Hsu B.D., Lee J.Y. A study on the fluorescence induction curve of the DCMU-poisoned chloroplast. // Biochim. Biophys. Acta, – 1991. – vol. 1056. – no. 3. – pp. 285–292. – DOI: 10.1016/S0005-2728(05)80060-X.
 61. Hsu B.D., Lee J.Y. The photosystem II heterogeneity of chlorophyll b-deficient mutants of rice: a fluorescence induction study. // Aust. J. Plant Physiol. – 1995. – vol. 22. – no. 2. – pp. 195–200. – DOI: 10.1071/PP9950195.
 62. Hsu B.D., Lee Y.S., Jang Y.R. A method for analysis of fluorescence induction curve from DCMU-poisoned chloroplasts. // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – vol. 975. – no. 1. – pp.44–49. – DOI: 10.1016/S0005-2728(89)80199-9.
 63. Huang M., Zhu H., Zhang J., Tang D., Han X., Chen L., Du D., Yao J., Chen K., Sun J. Toxic effects of cadmium on tall fescue and different responses of the photosynthetic activities in the photosystem electron donor and acceptor sides. // Scientific Reports. – 2017. – vol. – no. 7. – pp. 14387. – DOI: 10.1038/s41598-017-14718-w.
 64. Hunter J.D. Matplotlib: A 2D graphics environment. // Computing in Science & Engineering. – 2007. – vol. 9. – no. 3. 90–95. – DOI: 10.1109/MCSE.2007.55.
 65. Ibanez H., Ballester A., Munoz R., Quiles M.J. Chlororespiration and Tolerance to Drought, Heat and High Illumination // J. Plant Physiol. – 2010. – vol. 167. – pp. 732–738.
 66. Joët T, Genty B, Josse E.M., Kuntz M., Cournac L., Peltier G. Involvement of a Plastid Terminal Oxidase in Plastoquinone Oxidation as Evidenced by Expression of the *Arabidopsis thaliana* Enzyme in Tobacco // J. Biol. Chem. – 2002. – vol. 277. – pp. 31623–31630.

67. John E.H., Flynn K.J. Modelling Phosphate Transport and Assimilation in Microalgae; How Much Complexity is Warranted? // *Ecol. Modell.* – 2000. – vol. 125. – pp. 145–157. doi:10.1016/S0304-3800(99)00178-7.
68. Joliot A., Joliot P. Etude cinétique de la réaction photochimique libérant l'oxygène au cours de la photosynthèse. // *C. R. Acad. Sci. Paris.* 1964. – vol. 258. – pp. 4622–4625.
69. Kalaji H., Goltsev V.N., Żuk-Golaszewska K., Zivcak M., Brestic M. // *Chlorophyll Fluorescence: Understanding Crop Performance – Basics and Applications.* – 2017– CRC Press () - 10.1201/9781315153605.
70. Kalaji H.M., Schansker G., Brestic M., Bussotti F., Calatayud A., Ferroni L., Goltsev V., Guidi L., Jajoo A., Li P., Losciale P., Mishra V.K., Misra A.N., Nebauer S.G., Pancaldi S., Penella C., Pollastrini M., Suresh K., Tambussi E., Yanniccari M., Zivcak M., Cetner M.D., Samborska I.A., Stirbet A., Olsovska K., Kunderlikova K., Shelonzek H., Rusinowski S., Baba W. Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. // *Photosynth Res.* – 2016. – vol. 132. – no. 1. – pp. 13-66. – DOI: 10.1007/s11120-016-0318-y.
71. Kalaji HM, Schansker G, Brestic M, Bussotti F, Calatayud A, Ferroni L, Goltsev V, et al. Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. // *Photosynth Res.* – 2016. – vol. 132. – no. 1. pp. 13-66. <https://doi.org/10.1007/s11120-016-0318-y>
72. Khan I, Sohail, Zaman S, Li G, Fu M. Adaptive responses of plants to light stress: mechanisms of photoprotection and acclimation. A review. // *Frontiers in Plant Science.* –2025. – vol. 16 – p.1550125. – doi: 10.3389/fpls.2025.1550125
73. Kuntz M. Plastid Terminal Oxidase and Its Biological Significance // *Planta.* –2004. –vol. 218. – pp. 896–899.
74. Kuvykin I.V., Ptushenko V.V., Vershubskii A.V., Tikhonov A.N. Regulation of Electron Transport in C3 Plant Chloroplasts In Situ and In Silico: Short-Term Effects of Atmospheric CO₂ and O₂ // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – vol. 1807. – pp. 336–347.
75. Lavrinovics A., Murby F., Ziverte E., Mežule L., Juhna T. Increasing Phosphorus Uptake Efficiency by Phosphorus-Starved Microalgae for Municipal Wastewater Post-Treatment // *Microorganisms.* – 2021. – vol. 9. – pp. 1598. – doi:10.3390/microorganisms9081598.
76. Lazar D, Pospisil P. Mathematical simulation of chlorophyll *a* fluorescence rise measured with 3-(3',4'-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea-treated barley

- leaves at room and high temperatures. // Eur Biophys J. – 1999. – vol. 28(6). – pp. 468-477. doi.org/10.1007/s002490050229.
77. Lazar D. Chlorophyll a fluorescence rise induced by high light illumination of dark-adapted plant tissue studied by means of a model of photosystem II and considering photosystem II heterogeneity // J. Theor. Biol. – 2003. – vol. – 220. – pp. 469–503.
 78. Lazar D., Tomek P., Ilik P., Nauš J. Determination of the antenna heterogeneity of Photosystem II by direct simultaneous fitting of several fluorescence rise curves measured with DCMU at different light intensities. // Photosyn. Res. – 2001. – pvol. 68. – no. 3. – pp. 247–257. – DOI: 10.1023/A:1012973402023.
 79. Liu B., Napiwotzki A., Eckert H.-J., Eichler H.J., Renger G. Studies on the Recombination Kinetics of the Radical Pair $P_{680}^{\cdot+}Pheo^-$ in Isolated PS II Core Complexes from Spinach // Biochim. Biophys. Acta. – 1993. – vol. 1142. – pp. 129–138.
 80. Lovyagina E.R., Semin B.K. Mechanism of inhibition and decoupling of oxygen evolution from electron transfer in photosystem II by fluoride, ammonia and acetate. // Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology. – 2016. – vol. 158. – pp. 145–153. – DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.02.031.
 81. Malkin S., Armond P. A., Mooney H. A., and Fork D. C. Photosystem II Photosynthetic Unit Sizes from Fluorescence Induction in Leaves: Correlation to Photosynthetic Capacity. // Plant Physiology. – 1981. – vol. 67. – no. 3. – pp. 570–579. DOI: 10.1104/pp.67.3.570.
 82. Malkin S., Kok B. Fluorescence induction studies in isolated chloroplasts. I- Number of components involved in the reaction and quantum yields. Biochim. Biophys. Acta. – 1966. – vol. 126. – no. 3. – pp. 413–432. DOI: 10.1016/0926-6585(66)90001-x.
 83. Markou G., Dao L.H.T., Muylaert K., and Beardall J. Influence of different degrees of N limitation on photosystem II performance and heterogeneity of *Chlorella vulgaris*. // Algal Res. – 2017. – vol. 26. – pp. 84–92. DOI: 10.1016/j.algal.2017.07.005.
 84. Martin E., Samoilova R.I., Narasimhulu K.V., Lin T.-J., O'Malley P.J., Wraight C.A., Dikanov S.A. Hydrogen Bonding and Spin Density Distribution in the Q_B Semiquinone of Bacterial Reaction Centers and Comparison with the Q_A Site // J. Am. Chem. Soc. – 2011. – vol. 133. – pp. 5525–5537.

85. Martín M., Funk H.T., Serrot P.H., Poltnigg P., Sabater B. Functional Characterization of the Thylakoid ndh Complex Phosphorylation by Site-Directed Mutations in the ndhF Gene // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – vol. 1787. – pp. 920–928.
86. Marx A., A. A. de Graaf, W. Wiechert, L. Eggling, H. Sahm Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing. // *Biotechnol. Bioeng.* – 1996. – vol. 49. – pp. 111-129.
87. Mathur S., Allakhverdiev S.I., and Jajoo A. Analysis of high temperature stress on the dynamics of antenna size and reducing side heterogeneity of photosystem II in wheat (*Triticum aestivum*). // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – vol. 1807. no 1. – pp. 22–29. DOI: 10.1016/j.bbabbio.2010.09.001.
88. McCauley S.W., Melis A. Quantitation of photosystem II in spinach chloroplasts. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics.* – 1986. – vol. 849. – no. 2. – pp. 175–182. DOI: 10.1016/0005-2728(86)90023-x.
89. Melis A, Homann P. Heterogeneity of the photochemical centers in system II of chloroplasts. // *Photochem. Photobiol.* – 1976. – vol. 23. – pp. 343-350. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1976.tb07259.x.
90. Melis A. Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1991. – vol. 1058. – no. 2. – pp. 87–106. – DOI: 10.1016/S0005-2728(05)80225-7.
91. Melis A., Homann P. Kinetic analysis of the fluorescence induction in 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea poisoned chloroplasts. // *Photochem. Photobiol.* 1975. – vol. – 21. – pp. 431–437. – DOI: 10.1111/j.1751-1097.1975.tb06701.x.
92. Melis A., Zhang L., Forester M., Ghirardi M.L., Seibert M. Sustained Photobiological Hydrogen Gas Production upon Reversible Inactivation of Oxygen Evolution in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* // *Plant Physiol.* – 2000. – vol. 122. – pp. 127–135.
93. Miegheem F., Brettel K., Hillmann B., Kamlowski A., Rutherford W., Schlodder E. Charge Recombination Reactions in Photosystem II. 1. Yields, Recombination Pathways, and Kinetics of the Primary Pair // *Biochemistry.* – 1995. – vol. 34. – pp. 4798–4813.
94. Miegheem F.J.E., Nitschke W., Mathis P., Rutherford A.W. The Influence of the Quinone-Iron Electron Acceptor Complex on the Reaction Centre

- Photochemistry of Photosystem II // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1989. – vol. 977. – pp. 207–214.
95. 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.
 96. Murabito Ettore, Evangelos Simeonidis, Kieran Smallbone and Jonathan Swinton. Capturing the essence of a metabolic network: A flux balance analysis approach. // *Journal of Theoretical Biology.* – 2009. – vol. 260. – no. 3. – pp. 445–452.
 97. Murata N., Nishimura M., and Takamiya A. Fluorescence of chlorophyll in photosynthetic systems. II. Induction of fluorescence in isolated spinach chloroplasts. // *Biochim Biophys Acta.* – 1966. – vol. 120. – no. 1. – pp. 23–33. DOI: 10.1016/0926-6585(66)90273-1.
 98. Muthuraj, M., Palabhanvi, B., Misra, S.; Kumar, V., Sivalingavasu, K., Das, D. Flux Balance Analysis of *Chlorella s. FC2* IITG under Photoautotrophic and Heterotrophic Growth Conditions. // *Photosynth. Res.* – 2013. – vol. 118. – pp. 167–179. doi:10.1007/s11120-013-9943-x.
 99. Nanette R. B., Morgan J. A. Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. // *BMC Systems Biology.* – 2009. – vol. 3 no.4. – doi:10.1186/1752-0509-3-4
 100. Nedbal L., Gibas C., and Whitmarsh J. Light saturation curves show competence of the water splitting complex in inactive Photosystem II reaction centers. // *Photosynthesis Research.* – 1991. – vol. 30. – no. 2. – pp. 85–94. – DOI: 10.1007/bf00042006.
 101. Newville M., Otten R., Nelson A. et al. LMFIT: Non-Linear Least-Square Minimization and Curve-Fitting for Python. // *Zenodo.* 2023. DOI: 10.5281/zenodo.598352
 102. Nixon P.J., Rich P.R. Chlororespiratory Pathways and Their Physiological Significance // *The Structure and Function of Plastids* / Eds. Wise R.R., Hooper J.K. Berlin: Springer-Verlag. – 2007. – pp. 237–251.
 103. Noguchi T., Kurreck J., Inoue Y., Renger G. Comparative FTIR Analysis of the Microenvironment of $Q_A^{\bullet-}$ in Cyanide-Treated, High pH-Treated and Iron-Depleted Photosystem II Membrane Fragments // *Biochemistry.* – 1999. – vol. 38. – pp. 4846–4852.

104. Nyberg G.B., Balcarcel R.R., B. D. Follstad, Stephanopouluos G., Wang D.I.C., Metabolism of peptide amino acid by Chinese Hamster ovary cells grown in a complex medium. // *Biotechnol. Bioeng.* – 1999. – vol. 62. – pp. 324-335.
105. Oukarroum A., El Madidi S., Schansker G. et al.: Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. // *Environ. Exp. Bot.* – 2007. – vol. 60. – pp. 438-446.
106. Oukarroum A., Schansker G., Strasser R. J. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl a fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. // *Plant Physiol.* – 2009. – vol. 137. – pp. 188-199.
107. Pan X.L., Deng C.N., Zhang D.Y., Wang J.L., Mu G.J., and Chen Y. Toxic effects of amoxicillin on the photosystem II of *Synechocystis* sp characterized by a variety of in vivo chlorophyll fluorescence tests. // *Aquat. Toxicol.* – 2008. – vol. 89. – no. 4. – pp. 207–213. DOI: 10.1016/j.aquatox.2008.06.018.
108. Parmar P., Kumari N., Sharma V. Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress. // *Botanical Studies.* – 2013. – vol. 54. – no. 1. – pp. 45. – DOI: 10.1186/1999-3110-54-45.
109. Peltier G., D. Tolleter, E. Billon, L. Cournac. Auxiliary electron transport pathways in chloroplasts of microalgae // *Photosynth Res.* – 2010. – vol. 106. – pp. 19–31.
110. Peng L., Yamamoto H., Shikanai T. Structure and Biogenesis of the Chloroplast NAD(P)H Dehydrogenase Complex // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – vol. 1807. – pp. 945–953.
111. 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. – no. 2. – pp. 277–282.
112. 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. – no. 7. – p. 254.

113. 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. – no. 2-3. – pp. 303–320.
114. 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. – no. 12. – p. 3571.
115. 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. – no. 2. – pp. 197–217.
116. 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.
117. Posewitz M. C., P.W. King, S. L. Smolinski, R. Davis Smith, A. R. Ginley, M. L. Ghirardi, M. Seibert Identification of genes required for hydrogenase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. // *Biochem Soc Trans*. 2005. – vol. 33 – pp. 102–104.
118. Postnikov E.B., Lavrova A.I., Kiseliy 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. – no. 12. – p. 1250293.
119. Raihan M.R.H., Antal M., Stróżecki M. *et al.* Silicon-induced photosynthetic adaptations in common buckwheat under salt stress revealed by prompt chlorophyll *a* fluorescence analysis. // *Scientific Reports*. – 2025. – vol. 15, – p. 19343 – <https://doi.org/10.1038/s41598-025-04159-1>
120. Rapacz M, Wójcik-Jagła M, Fiust A, Kalaji HM and Kościelniak J. Genome-Wide Associations of Chlorophyll Fluorescence OJIP Transient Parameters Connected With Soil Drought Response in Barley. // *Front. Plant Sci*. – 2019. – 10:78. doi: 10.3389/fpls.2019.00078
121. Renger G. Photosynthetic water oxidation to molecular oxygen: apparatus and mechanism // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2001. – vol. 1503. – pp. 210–228.

122. Renger G., Holzwarth A.R. Primary electron transfer // In Photosystem II: the light driven water:plastoquinone oxidoreductase. Advances in photosynthesis and respiration / Ed. Wydrzynski T, Satoh K. Springer, Dordrecht. 2005. V. 22. P. 139–175.
123. Renger G., Renger T. Photosystem II: the machinery of photosynthetic water splitting // Photosynth. Res. – 2008. – vol. 98. – pp. 53–80.
124. Ried M.K., Wild R., Zhu J., Pipercevic J., Sturm K., Broger L., Harmel R.K., Abriata L.A., Hothorn L.A., Fiedler, D. et al. Inositol Pyrophosphates Promote the Interaction of SPX Domains with the Coiled-coil Motif of PHR Transcription Factors to Regulate Plant Phosphate Homeostasis. // Nat. Commun. – 2021. – vol. 12. – pp. 384, doi:10.1038/s41467-020-20681-4.
125. 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. – no. 4. – pp. 985–1004.
126. Rodríguez M. C., Barsanti L., Passarelli V., Evangelista V., Conforti V., Gualtieri P. Effects of chromium on photosynthetic and photoreceptive apparatus of the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. // Environmental Research. – 2007. – vol. 105. – no 2. – pp. 234–239. – DOI: 10.1016/j.envres.2007.01.011.
127. Roelofs T.A., Lee C.-H., Holzwarth A.R. Global target analysis of picosecond chlorophyll fluorescence kinetics from pea chloroplasts: A new approach to the characterization of the primary processes in photosystem II α - and β -units // Biophys. J. – 1992. – vol. 61. – no. 5. – pp. 1147–1163.
128. Roels J. A. Application of macroscopic principles to microbial metabolism. // Biotechnol. Bioeng. – 1980. – vol. 22. – pp. 2457–2514.
129. Rubin A.B., Riznichenko G.Yu. Mathematical Biophysics. New York: Springer, 2014. 273 p.
130. Rubin A.B., Riznichenko G.Yu. Modeling of the primary processes in a photosynthetic membrane. In: Photosynthesis in silico: understanding complexity from molecules to ecosystems (Laisk A, Nedbal L, Govindjee eds), Dordrecht: Springer. – 2009. – vol 29. – pp.151–176.
131. Sanz-Luque E., Bhaya D., Grossman A.R. Polyphosphate: A Multifunctional Metabolite in Cyanobacteria and Algae. // Front. Plant Sci. – 2020. – vol. 11. – pp. 938. – doi:10.3389/fpls.2020.00938.

132. Sas K.N., Kovács L., Zsíros O., Gombos Z., Garab G., Hemmingsen L., Danielsen E. Fast cadmium inhibition of photosynthesis in cyanobacteria in vivo and in vitro studies using perturbed angular correlation of γ -rays. // *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. – 2006. – vol. 11. – no. 6. – pp. 725–734. – DOI: 10.1007/s00775-006-0113-x.
133. Schatz G.H., Brock H., Holzwarth A.R. Kinetic and energetic model for the primary processes in photosystem II // *Biophys J*. – 1988. – vol. 54. – pp. 397-405.
134. Schmidt K., Marx A., de Graaf A., Wiechert H., Sahm J., Nielsen J., Villadsen ^{13}C tracer experiments and metabolite balancing for metabolic flux analysis: comparing two methods. // *Biotechnol. Bioeng.* – 1998. – vol. 58. – pp. 254-257.
135. Sigfridsson K.G.V., Bernat G., Mamedov F., Styring S. Molecular interference of Cd^{2+} with Photosystem II. // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2004. – vol. 1659. – pp. 19 – 31. – DOI: 10.1016/j.bbabo.2004.07.003.
136. Simeonidis E., Price N.D. Genome-scale modeling for metabolic engineering. // *J Ind Microbiol Biotechnol*. – 2015. –vol. 42. – pp. 327–338.
137. Singh D., Nedbal L., Ebenhöf O. Modelling Phosphorus Uptake in Microalgae. // *Biochem. Soc. Trans.* – 2018. – vol. 46. – pp. 483–490. – doi:10.1042/BST20170262.
138. Singh-Tomar R., Mathur S., Allakhverdiev S.I., Jajoo A. Changes in PS II heterogeneity in response to osmotic and ionic stress in wheat leaves (*Triticum aestivum*). // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2012. – vol. 44. – no. 4. – pp. 411–419. – DOI: 10.1007/s10863-012-9444-1.
139. Sipka G., Magyar M., Mezzetti A., Akhtar P., Zhu Q., Xiao Y., Han G., Santabarbara S., Shen J.R., Lambrev P.H. and Garab G. Light-adapted charge-separated state of photosystem II: structural and functional dynamics of the closed reaction center. // *Plant Cell*. 2021. – vol. 33. – pp. 1286–1302. – DOI: 10.1093/plcell/koab008.
140. Slocombe S.P., Zuñiga-Burgos T., Chu L., Wood N.J., Camargo-Valero M.A., Baker A. Fixing the Broken Phosphorus Cycle: Wastewater Remediation by Microalgal Polyphosphates. // *Front. Plant Sci.* – 2020. – vol. 11. – pp. 982. doi:10.3389/fpls.2020.00982.
141. Solovchenko A., Ismagulova T., Lukyanov A., Vasilieva S., Konyukhov I., Pogosyan S., Lobakova E., Gorelova O. Luxury Phosphorus Uptake in Microalgae. // *J. Appl. Phycol.* – 2019. – vol. 31. – pp. 2755–2770. doi:10.1007/s10811-019-01831-8.

142. Solovchenko A., Khozin-Goldberg I., Selyakh I., Semenova L., Ismagulova T., Lukyanov A., Mamedov I., Vinogradova E., Karpova O., Konyukhov I., et al. Phosphorus Starvation and Luxury Uptake in Green Microalgae Revisited. *Algal Res.* – 2019. – vol. 43. – pp. 101651 – doi:10.1016/j.algal.2019.101651.
143. Solovchenko A., Verschoor A.M., Jablonowski N.D., Nedbal L. Phosphorus from Wastewater to Crops: An Alternative Path Involving Microalgae. // *Biotechnol. Adv.* – 2016. – vol. 34. – pp. 550–564. – doi:10.1016/j.biotechadv.2016.01.002.
144. Steffen R., Eckert H.-J., Kelly A.A., Dormann P., and Renger G. Investigations on the Reaction Pattern of Photosystem II in Leaves from *Arabidopsis thaliana* by Time-Resolved Fluorometric Analysis // *Biochemistry.* – 2005. – vol. 44. – no 9.
145. Stirbet A., Govindjee. Chlorophyll a fluorescence induction: a personal perspective of the thermal phase, the J–I–P rise // *Photosynth. Res.* – 2012. vol. 113. – pp. 15–61.
146. Stirbet A., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B., Govindjee. Modeling chlorophyll a fluorescence transient: relation to photosynthesis. // *Biochemistry (Moscow).* 2014. –vol. 79. – pp. 291-323.
147. Stirbet A., Strasser R.J. Numerical simulation of the in vivo fluorescence in plants // *Math. Compu. Simul.* – 1996. –vol. 42. – pp. 245–253.
148. Stirbet, A., Govindjee, Strasser, B.J., Strasser R.J. Chlorophyll a fluorescence induction in higher plants: modelling and numerical simulation // *J. Theor. Biol.* – 1998. – vol. 193. – pp. 131–151.
149. Strasser B. Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients. // *Photosynthesis Research.* 1997. – vol. 52. – pp. 147-155.
150. Strasser R. J., Tsimilli-Michael M. and Srivastava A.: Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient. In: George C. Papageorgiou and Govindjee (eds), *Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis.* Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 321-362, 2004.
151. Strasser R.J., Stirbet A.D. Estimation of the energetic connectivity of PS II centres in plants using the fluorescence rise O–J–I–P Fitting of experimental data to three different PS II models // *Mathematics and Computers in Simulation.* – 2001. – vol. 56. – pp. 451–461.
152. Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A. Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient / In: Papageorgiou G.C., Govindjee (eds)

- Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Volume 19. Springer, Dordrecht, 2004, pp. 321-362. DOI: 10.1007/978-1-4020-3218-9_12
153. Tamiya H.: Mass Culture of Algae. // *Annual Review of Plant Physiology*. – 1957. – vol. 8. – pp. 309-334.
 154. Terentyev V.V., Shukshina A.K., Ashikhmin A.A., Tikhonov K.G., Shitov A.V. The Main Structural and Functional Characteristics of Photosystem-II-Enriched Membranes Isolated from Wild Type and *cia3* Mutant *Chlamydomonas reinhardtii*. // *Life*. – 2020. – vol. 10. – no. 5. – pp. 63. – DOI: 10.3390/life10050063.
 155. Terentyev V.V., Shukshina A.K., Shitov A.V. Carbonic anhydrase CAH3 supports the activity of photosystem II under increased pH. // *BBA – Bioenergetics*. – 2019. – vol. 1860. – pp. 582–590. – DOI: 10.1016/j.bbabo.2019.06.003.
 156. Tikhonov A., Vershubskii A. Temperature dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts in vitro and in silico // *Photosynthesis Research*. – 2020. – vol. 146. – pp. 299-329.
 157. Tolstygina I.V., Antal T.K., Kosourov S.N., Krendeleva T.E., Rubin A.B., Tsygankov A.A. Hydrogen Production by Photoautotrophic Sulfur-Deprived *Chlamydomonas reinhardtii* Pre-Grown and Incubated under High Light // *Biotechnol. Bioeng.* – 2009. – vol. 102. pp. 1055–1061.
 158. Umena Y., Kawakami K., Shen J.R., and Kamiya N. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature*, 473 (7345), 55-60 (2011). DOI: 10.1038/nature09913
 159. Vallino J.J., Stephanopoulos G. Carbon flux distribution at the pyruvate branch point in *Corynebacterium glutamicum* during lysine overproduction // *Biotechnol Prog.* – 1994. – vol. 10. – pp. 327-334.
 160. Van Bezouwen L. S., Caffarri S., Kale R. S., Kouřil R., Thunnissen A.-M. W. H., Oostergetel G. T., and Boekema E. J. Subunit and chlorophyll organization of the plant photosystem II supercomplex. // *Nat. Plants*. – 2017. – vol. 3. – no. 7. – pp. 17080. – DOI: 10.1038/nplants.2017.80.
 161. Varma A., Palsson B.O. Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use. // *Nature Biotechnology*. – 1994. – vol. 12. – pp. 994–998.
 162. Vass I., Styring S., Hundal T., Koivuniemi A., Arot E.-M., Andersson B. Reversible and Irreversible Intermediates during Photoinhibition of Photosystem II: Stable Reduced Q_A Species Promote Chlorophyll Triplet Formation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1992. – vol. 89. – pp. 1408–1412.

163. Vershubskii A.V., Nevyantsev S.M., Tikhonov A.N. Modeling of Electron and Proton Transport in Chloroplast Membranes with Regard to Thioredoxin-Dependent Activation of the Calvin–Benson Cycle and ATP Synthase // *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A.* – 2018. – vol. 12. –no. 3. – pp. 287-302. – doi.org/10.1134/S1990747818020150
164. Vershubskii, A.V., Nevyantsev, S.M. & Tikhonov, A.N. Modeling of Electron and Proton Transport in Chloroplast Membranes with Regard to Thioredoxin-Dependent Activation of the Calvin–Benson Cycle and ATP Synthase. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A* **12**, 287–302 (2018). <https://doi.org/10.1134/S1990747818020150>
165. Vijay S., Yuan Q. Simplified Empirical Model for Phosphorous Removal in a Facultative Wastewater Lagoon. // *J. Environ. Manage.* – 2017. – vol. 201. – pp. 1–5. doi:10.1016/j.jenvman.2017.06.023.
166. Vredenberg W.J. Analysis of initial chlorophyll fluorescence induction kinetics in chloroplasts in terms of rate constants of donor side quenching release and electron trapping in photosystem II. // *Photosynth. Res.* – 2008. – vol. 96. – pp. 83-97.
167. Vredenberg W.J., Prasil O. Modeling of chlorophyll a fluorescence kinetics in plant cells: derivation of a descriptive algorithm / In: Laisk A., Nedbal L., Govindjee (eds) *Photosynthesis in silico: understanding complexity from molecules to ecosystems. Advances in photosynthesis and respiration. Volume 29.* Springer, Dordrecht, 2009, pp. 125–149.
168. Wang, R. T., Myers, J. Energy Transfer Between Photosynthetic Units Analyzed by Flash Oxygen Yield Vs. Flash Intensity. // *Photochemistry and Photobiology.* – 1973. – vol. 17. – no. 5. – pp. 321–332. DOI: 10.1111/J.1751-1097.1973.Tb06360.X.
169. Wu C., W. Xiong, J. Dai, and Q. Wu, Genome-Based Metabolic Mapping and ¹³C Flux Analysis Reveal Systematic Properties of an Oleaginous Microalga *Chlorella protothecoides*. // *Plant Physiol.* – 2015. – vol. 167. – pp. 586–599.
170. Wykoff D. D., J. P. Davies, A. Melis, A. Grossman, The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii* // *Plant Physiol.* – 1998. – vol. 117. – pp. 129–139.
171. Yang C., Hua Q., Shimizu K. Metabolic Flux Analysis in *Synechocystis* Using Isotope Distribution from ¹³C-Labeled Glucose. // *Metabolic Engineering.* – 2002.– vol. 4. – pp. 202–216.

172. Zhang L., Happe T., Melis A. Biochemical and Morphological Characterization of Sulfur-Deprived and H₂-Producing *Chlamydomonas reinhardtii* (Green Alga) // *Planta*. – 2002. – vol. 214. – pp. 552–561.
173. Zhu X.-G., Govindjee, Baker N.R., DeSturler E., Ort D.R., Long S.P. Chlorophyll a fluorescence induction kinetics in leaves predicted from a model describing each discrete step of excitation energy and electron transfer associated with Photosystem II // *Planta*. – 2005. – vol. 223. – pp. 114–133.
174. Zupke C., G. Stephanopoulos Intracellular flux analysis in hybridomas using mass balances and in vitro ¹³C-NMR. // *Biotechnol. Bioeng.* – 1995. – vol. 45. – pp. 292–303.
175. Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В., Мейчик Н.Р., Носов А.М., Полесская О.Г, Харитонашвили Е.В., Чуб В.В. Физиология растений: учебник для студ. Вузов. Под ред. И.П. Ермакова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 640 с.
176. 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.
177. Лаврова А.И., Плюснина Т.Ю., Булычев А.А., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Моделирование гистерезиса в распределении pH вблизи мембраны клетки водоросли *Chara corallina* // *Биофизика*. – 2005. – Т. 50. – № 6. – С. 1088–1094.
178. 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
179. Лаврова А.И., Плюснина Т.Ю., Украинец А.В., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Нелинейная динамика трансмембранного потенциала и pH в примембранной области клетки харовых водорослей // *Компьютерные исследования и моделирование*. – 2009. – Т. 1. – № 2. – С. 233–239.
180. 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.
181. 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.
182. 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.
183. Плюснина Т.Ю., Лаврова А.И., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Моделирование неоднородного распределения и колебаний трансмембранного потенциала и pH вблизи внешней стороны мембраны клетки водоросли *Chara corallina* // Биофизика. – 2005. – Т. 50. – № 3. – С. 492–499.
184. Плюснина Т.Ю., Лаврова А.И., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Роль протонной АТФ-азы в возникновении нелинейной динамики pH и электрического потенциала на клеточной мембране // Динамические модели процессов в клетках и субклеточных наноструктурах (под ред. Г.Ю. Ризниченко и А.Б. Рубина), (НИЦ Регуляция и хаотическая динамика, Ин-т компьютерных исследований. Москва-Ижевск). – 2010. – С. 264–284. <https://rucont.ru/efd/301519>.
185. 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.
186. 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.
187. 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.
188. Погосян С.И., Гальчук С.В., Казимирко Ю.В., Конюхов И.В., Рубин А.Б. Применение флуориметра «МЕГА-25» для определения количества

- фитопланктона и оценки состояния его фотосинтетического аппарата // Вода: химия и экология. – 2009. – № 6. – С. 34-40.
189. 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.
190. 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.
191. 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. (Институт компьютерных исследований. Москва-Ижевск). – 2017. – С. 420–443.
<https://publications.hse.ru/books/211888784?ysclid=mn2278lgcc90687041>.
192. Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Динамические модели электронного транспорта в фотосинтезе. 332 с. Изд. ИКИ 2020.
193. Тихонов А.Н. О зависимости решений дифференциальных уравнений от малого параметра. // Матем. сб. – 1948. – Т. 22 (64), №2. – С. 193–204.
194. Тихонов А.Н. Системы дифференциальных уравнений, содержащие малые параметры при производных. // Мат. сб. – 1952– Т. 32. – №3
195. 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.