

$\eta = \eta_{\text{плазмы}}$, получаем

$$\eta_{\text{плазмы}} = C_{\text{кон}} e^{\alpha \cdot 0}$$

учитывая что $e^0=1$, получаем $C_{\text{кон}} = \eta_{\text{плазмы}}$

В итоге получаем частное решение дифференциального уравнения

$$\eta = \eta_{\text{плазмы}} e^{\alpha \cdot H}.$$

Данное выражение является вполне работающей в гематологии математической моделью, где коэффициент пропорциональности α называется фактором формы эритроцита и рассчитывается как отношение диаметра эритроцита к его толщине.

В заключении хотелось бы отметить эффективность данного подхода с точки зрения особенностей преподавания биофизики на первом курсе медицинских ВУЗов. Во-первых, данный метод изложения базируется на темах школьной математики, во-вторых, даже небольшое время отведенное на данный раздел позволяет изучить основные понятия дифференциальных уравнений необходимых для построения математических моделей и в-третьих, изложение этапов построения математических моделей является простым и наглядным, легко понимается и применяется студентами в различных междисциплинарных задачах.

Список литературы / References:

1. Лобочка Н.Л., Морозов Ю.В., Дунаев А.А. *Высшая математика*. Минск: «Вышэйшая школа», 1987, 361 с. [Lobockaya N.L., Morozov Yu.V., Dunaev A.A. *Higher mathematics*. Minsk: «Vyshehshaya shkola», 1987, 361 p. (In Russ.)]
2. Резниченко Г.Ю. *Лекции по математическим моделям в биологии*. Ч. 1, Москва-Ижевск. Научно-издательский центр «Регулярная и хаотическая динамика», 2002, с. 231. [Reznichenko G.Yu. *Lectures on mathematical models in biology*. — Ch. 1, Moscow-Izhevsk. Nauchno-izdatel'skij centr «Regulyarnaya i haoticheskaya dinamika», 2002, 231 p. (In Russ.)]
3. Самарский А.А., Михайлов А.П. *Математическое моделирование. Идеи. Методы. Примеры*. М.: Физматлит, 2001, 320 с. [Samarskij A.A., Mihajlov A.P. *Mathematical modeling. Ideas. Methods. Examples*. M.: Fizmatlit, 2001, 320 p. (In Russ.)]
4. Петров И.Б. Математическое моделирование в медицине и биологии на основе моделей механики сплошных сред. *Труды МФТИ*, 2009, т. 1, № 1, с. 5-16. [Petrov I.B. *Mathematical modelling in medicine and biology based on models of continuum mechanics*. *Trudy MFTI*, 2009, vol. 1, no. 1, pp. 5-16. (In Russ.)]
5. Смиряев А.В., Исачкин А.В., Панкина Л.К. *Моделирование в биологии и сельском хозяйстве*: уч. пособие. Издание 3-е исправленное. М.: Издательство РГАУ-МСХА, 2015, 153 с. [Smiryaev A.V., Isachkin A.V., Pankina L.K. *Modeling in biology and agriculture: textbook*. Izdanie 3-e ispravlennoe. M.: Izdatel'stvo RGAU-MSHA, 2015, 153 p. (In Russ.)]

ФРОНТ СПАДА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ ВСПЫШКИ КЛЕТКИ *Noctiluca scintillans*

Евстигнеев В.П.¹, Папкина А.С.²

¹Севастопольский государственный университет
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ
e-mail: vald_e@rambler.ru,

²Морской гидрофизический институт РАН
ул. Капитанская, 2, г. Севастополь, 299011, РФ

Аннотация. На основании известных теоретических представлений о фотобиохимической основе свечения клеток *Noctiluca scintillans* получена аналитическая формула расчета скорости экспоненциального спада интенсивности биолюминесценции. Формула получена для случая времен протекания процесса светоизлучения далекого от инициации вспышки, чтобы исключить влияние нелинейных процессов, в частности распространение потенциала действия в тонком периферическом слое цитоплазмы клетки *Noctiluca scintillans*. Полученная формула отражает дополнительную связь между параметрами модели свечения *Noctiluca scintillans*, которая позволяет исключить один из шести оптимизационных параметров при аппроксимации теоретической кривой вспышки к экспериментальным данным. Анализ полученной формулы позволяет сделать вывод о том, что в зависимости от физиологического состояния клетки скорость экспоненциального спада фотоэмиссии может меняться, т.е. для одной и той же клетки можно ожидать вспышки с несколько отличающимся фронтом спада. Такой вывод подтверждается данными проведенных ранее измерений.

Ключевые слова: биолюминесценция, потенциал действия, фермент-субстратное взаимодействие, *Noctiluca scintillans*.

Noctiluca scintillans CELL BIOLUMINESCENT FLASH DECAYEvstigneev V.P.¹, Papkova A.S.²¹Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia

e-mail: vald_e@rambler.ru

²Marine Hydrophysical Institute of RAS,

Kapitanskaya str., 2, Sevastopol, 299011, Russia

Abstract. An analytical equation for exponential bioluminescence decay rate calculation was obtained using photobiochemical background of the light emission of *Noctiluca scintillans*. The equation was derived for light emission times elapsing well after flash initiation in order to avoid an influence of nonlinear process such as flash-triggering action potential propagation through thin peripheral layer of cell cytoplasm of *Noctiluca scintillans*. The equation derived imposes an additional constraint on *Noctiluca scintillans* flash model parameters enabling one to exclude one of the six optimization parameters while flash curve approximation by theoretical model. Analysis allows us to conclude dependence of exponential decay rate of photoemission on cell physiological state, that is for the same *Noctiluca scintillans* cell one can register flashes with different bioluminescence decay. Such a conclusion is confirmed by prior studies.

Key words: bioluminescence, flash-triggering action potential, enzyme-substrate interaction, *Noctiluca scintillans*.

Введение.

Морская биолуминесценция (излучение световых импульсов живыми организмами) является одним из самых распространенных явлений в Мировом океане. Существование биолуминесцентного поля в морских водах связано с присутствием планктонных организмов, способных при возбуждении генерировать световую энергию в видимом диапазоне волн, при этом доминирующая роль в этом принадлежит одноклеточным водорослям, преимущественно из класса динофитовых. К проблемам в исследовании биолуминесценции фитопланктонных организмов относится изучение видового состава, механизма возникновения вспышек, химических систем и т.д. Несмотря на отсутствие четкого представления о биологической роли этого эффекта, биолуминесценция обладает потенциально высокой практической значимостью, обусловленной тем, что светящиеся системы многих видов проявляют исключительно высокую чувствительность к некоторым токсическим загрязняющим веществам. Актуальность исследований биолуминесценции в этом направлении имеет неотъемлемый экологический аспект. Светоизлучение может рассматриваться в качестве индикатора воздействия различных факторов антропогенного характера [1].

При инструментальной регистрации обработка светового сигнала проводится путем определения его энергетических и временных характеристик [2-4]. В большинстве работ по исследованию биолуминесценции кинетические параметры вспышек используются в качестве индикаторов внутренних процессов, инициализирующих или модулирующих биолуминесценцию организма. Отдельной задачей является возможность таксономической идентификации организмов на основании специфических особенностей их свечения. Световой сигнал большинства организмов при стимуляции представляет собой хорошо сформированный импульс с крутым фронтом нарастания и более пологим фронтом спада, причем от вида стимуляции форма сигнала не зависит. Видовая специфика в кинетических параметрах световых импульсов выражена в основном во временных характеристиках (общая длительность отдельной вспышки, длительность на уровне 0,1 и 0,5 от максимальной амплитуды). Кроме того, идентификация может осуществляться с использованием спектральной характеристики светоизлучения, хотя, известно, что для морской биолуминесценции длины волн максимального излучения находятся в окрестностях 490 нм. Так в работе [5] была продемонстрирована возможность разделения морских организмов (в том числе фитопланктонных) по интенсивности свечения на определенных длинах волн и кинетическим параметрам вспышки (время нарастания и время спада) с использованием дискриминантного анализа. Успех этой работы был предопределен выбором различных групп морских организмов. Сложнее обстоит дело при видовом разделении светящихся микроводорослей.

Традиционным тест-объектом для биомониторинга морских вод является *Noctiluca scintillans* [1], учитывая связь ее биоэнергетики с биолуминесценцией и массовое развитие ночесветки в шельфовых зонах Мирового океана. «Популярность» данного организма обусловлена рядом особенностей: отсутствием у него фотосинтетической системы; достаточной интенсивностью свечения, сравнительно большими размерами (0.2-2.0 мм), практически шарообразной формой, возникновение биолуминесцентной реакции как спонтанно, так и при стимуляции (механическая, электрическая и др.). Несмотря на это характер свечения этого биологического объекта до конца не изучен.

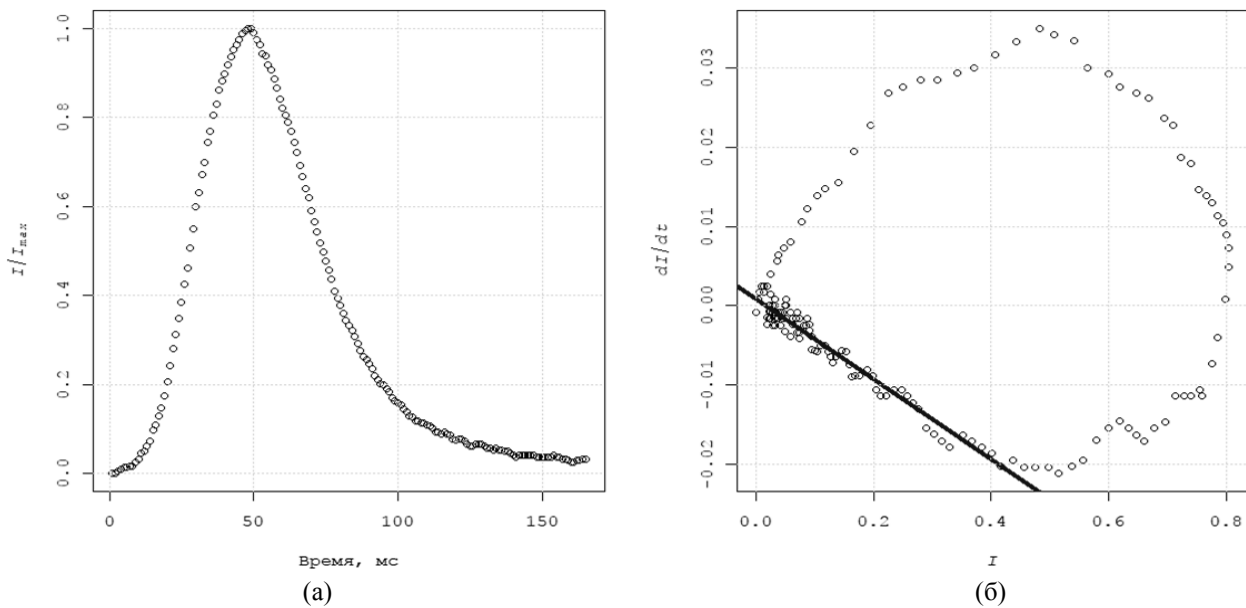


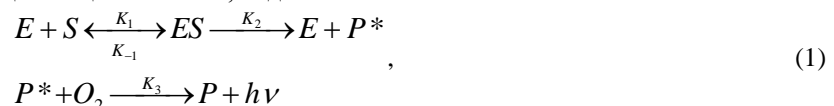
Рисунок 1 – Типичный световой импульс *Noctiluca scintillans* в пробе, отобранной 14 апреля 2011 г.: временная развертка импульса (а) и его представление на фазовой плоскости (б)

На рисунке 1 представлен типичный световой импульс *N.scintillans*. Характерной особенностью импульса ноктилюки является устойчивость его длительности (около 100 мс) и формы, в частности, относительно пологий фронт спада, который на фазовой плоскости отображается в виде прямолинейного участка. Такая довольно известная особенность световой вспышки характерна не только для ноктилюки и является следствием протекающей в сцинтиллонах клетки фотобиохимической реакции. Анализ причины, обуславливающей форму спада световой эмиссии *N.scintillans* посвящено настоящее исследование.

Теоретические предпосылки модели эмиссии света *N.scintillans*.

Биолуминесценция является сложным нелинейным процессом, изучение которого может проводиться с позиций молекулярной биофизики и биологии, биофизики возбудимых сред. Первое наиболее подробное описание кинетики биолуминесцентной вспышки *N. scintillans* было сделано Эккертом (см., например, [2]). Проведенный им подробный анализ биолуминесценции *N.scintillans* позволил выделить основные физические механизмы распространения светового импульса. Однако позже было показано [6], что важным этапом формирования биолуминесцентного сигнала является протекающая в сцинтиллонах фотобиохимическая реакция люциферин-люцифераза.

Согласно известным представлениям процесс световой эмиссии у ноктилюки протекает в специфических образованиях - сцинтиллонах, которые распределены в тонком периферическом слое цитоплазмы, разделяющий внешнюю мембрану клетки и мембрану вакуоли, которая, в свою очередь, занимает практический весь объем клетки *Noctiluca scintillans*. Регистрируемая стандартным методом биолуминесцентная макровспышка является суммой микровспышек каждого из сцинтиллонов. Эмиссия квантов света происходит по принципу «все или ничего» в ответ на понижение показателя pH в цитоплазме с 8 до 6. Вследствие релаксационных процессов в месте раздражения мембраны формируется локальный потенциал действия (ПД) [4]. Распространение ПД по сферической перивакуолярной цитоплазме от точки стимуляции осуществляется вдоль ее условного меридиана [2]. Световой фронт (вспышки органелл) следует за фронтом ПД через 1-3 мс. Длительность процесса распространения ПД по клетке оказывается существенно меньше типичной длительности макровспышки 100 мс [2-4]. Поэтому кинетика светового импульса не может быть объяснена только закономерностью распространения ПД. Дальнейшее развитие светового сигнала, в том числе и его спад, определяется кинетикой фотобиохимической реакции, протекающей в сцинтиллонах, вида:



где E – люцифераза; S – люциферин; ES – промежуточный комплекс; P^* - возбужденный люциферин; P – неактивный (окисленный) люциферин. Точные экспериментальные данные и абсолютное понимание биохимии процесса на сегодняшний день отсутствуют [7]. По этой причине, в первом приближении будем считать, что в области фотобиохимической реакции присутствует достаточное и постоянное количество молекул кислорода O_2 , тогда согласно (1) интенсивность светоизлучения становится пропорциональной скорости образования продукта $I \sim P^*$. Уравнения, описывающие реакцию (1), имеют следующий вид:

$$\begin{cases} \frac{d[E]}{dt} = (k_{-1} + k_2)[ES] - k_1[E][S] \\ \frac{d[S]}{dt} = k_{-1}[ES] - k_1[E][S] \\ \frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] \\ \frac{d[P^*]}{dt} = k_2[ES] - K[P^*] \\ I = I_0 P^* \end{cases}, \quad (2)$$

где K – константа окисления возбужденной формы люциферина при условии постоянной концентрации кислорода; I – регистрируемая интенсивность светоизлучения. Используя формулу баланса массы выразим концентрацию фермента через другие переменные $[E] = [E_0] - [ES]$, где $[E_0]$ – общая концентрация фермента в клетке (во всех сцинтиллонах), которая, в первом приближении, при условии известной поверхностной плотности распределения фермента по мембране вакуоли σ_E имеет вид $[E_0] = 4\pi R^2 \sigma_E$. Подстановка этих выражений в (2) существенно упрощает систему уравнений. Из последних двух уравнений системы (2) вытекает, что решение для интенсивности световой эмиссии ищется по формуле:

$$I(t) = I_0 k_2 e^{-Kt} \int ES(t) e^{-Kt} dt. \quad (3)$$

Фронт спада световой эмиссии.

Выполним анализ уравнения (3) на участке спада кривой вспышки. Решение поставленной задачи целесообразно проводить при условии достаточно большого времени световой эмиссии с момента инициации вспышки, чтобы исключить влияние нелинейных процессов, в частности распространение ПД в подмембранном пространстве клетки *Noctiluca scintillans*. При условии $t \gg 0$ концентрации $[S]$ и $[ES]$ становятся достаточно малыми, в результате система (2) сводится в линейной и с учетом введенных выше соотношений принимает вид (4):

$$\begin{cases} \frac{d[S]}{dt} = k_{-1}[ES] - 4\pi R^2 \sigma_E k_1 [S] \\ \frac{d[ES]}{dt} = 4\pi R^2 \sigma_E k_1 [S] - (k_{-1} + k_2)[ES] \\ \frac{d[P^*]}{dt} = k_2[ES] - K[P^*] \\ I = I_0 P^* \end{cases}. \quad (4)$$

Из ур.(3) следует, что кривая вспышки может быть получена теоретически в случае, если известен закон изменения концентрации промежуточного комплекса люциферин-люцифераза $[ES]$. Первые два уравнения системы (4) позволяют искать общее аналитическое решение для переменной $[ES]$ в виде:

$$ES(t) = C_1 e^{-\lambda_1 t} + C_2 e^{-\lambda_2 t}, \quad (5)$$

тогда интенсивность фотоэмиссии клетки *Noctiluca scintillans* на фронте спада найдется из выражения (3):

$$I(t) = I_0 k_2 \left(\frac{C_1}{K - \lambda_1} e^{-\lambda_1 t} + \frac{C_2}{K - \lambda_2} e^{-\lambda_2 t} \right).$$

Можно показать, что в пределе $\lim_{t \rightarrow \infty} I'/I = -\min(\lambda_1, \lambda_2) = -\lambda$ скорость изменения интенсивности световой эмиссии пропорциональна самой интенсивности, что великолепно подтверждается графиком на рис.1б, где прослеживается линейный участок кривой вспышки на фронте спада и откуда следует, что угловой коэффициент наклона прямолинейного участка на рис.2б равен $-\lambda$. Найдем величину этого параметра. Для этого необходимо решить характеристическое уравнение, приводящее к решению (5). Тогда параметр λ будет одним из его корней. Несложный расчет позволяет получить следующую формулу:

$$\lambda = \frac{1}{2} \left(4\pi R^2 \sigma_E k_1 + k_{-1} + k_2 - \sqrt{(4\pi R^2 \sigma_E k_1 + k_{-1} + k_2)^2 - 16\pi R^2 \sigma_E k_1 k_2} \right). \quad (6)$$

Интересно отметить, из (4) и (5) следует что $\lim_{t \rightarrow \infty} ES'/ES = \lim_{t \rightarrow \infty} P^*/P^* = -\min(\lambda_1, \lambda_2) = -\lambda$. На рисунке 2 представлены теоретические фазовые кривые вспышки I , концентрации продукта $[P^*]$ и комплекса люциферин-люцифераза $[ES]$, на котором виден похожий характер поведения кривых на фронте спада, а именно, одинаковый наклон прямолинейного участка кривых, определяемый параметром λ .

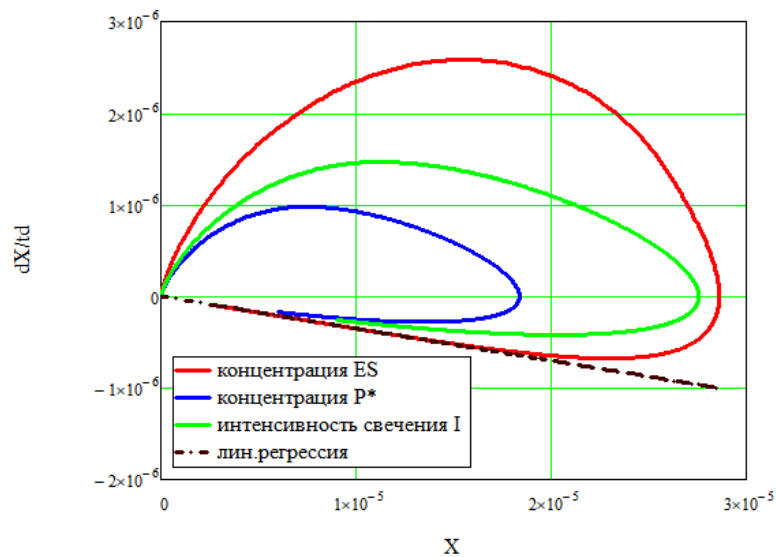


Рисунок 2 – Теоретические кривые вспышки I , концентрации продукта $[P^*]$ и комплекса люциферин-люцифераза $[ES]$, представленные в относительных единицах на фазовой плоскости

Из (6) следует, что угол наклона фазовой кривой помимо констант скоростей фермент-субстратной реакции зависит также от радиуса клетки и поверхностной плотности распределения фермента, т.е. фактически поверхностной плотности сцинтиллонов в клетке. Известно [7], что клетка *Noctiluca scintillans* задействует, как правило, до 5% сцинтиллонов. Соответственно в зависимости от физиологического состояния клетки это число может меняться, а, значит, должна меняться поверхностная плотность и, как следствие, скорость экспоненциального спада вспышки. Другими словами, для одной и той же клетки можно регистрировать вспышки с несколько отличающимся фронтом спада. Такой вывод также подтверждается данными измерений, в частности в [2].

Выводы.

Известные теоретические представления о фотобиохимической основе свечения клеток *Noctiluca scintillans* подтверждают хорошо известный факт того, что спад световой эмиссии носит экспоненциальный характер. В настоящей работе получена аналитическая формула расчета коэффициента спада интенсивности биолюминесценции. Полученная формула отражает дополнительную связь между параметрами модели свечения *Noctiluca scintillans*, которая позволяет исключить один из шести оптимизационных параметров (σ_E , σ_S , k_2 , k_1 , k_{-1} , R) при аппроксимации теоретической кривой вспышки к экспериментальным данным. Анализ полученной формулы позволяет сделать вывод о том, что в зависимости от физиологического состояния клетки скорость экспоненциального спада фотоэмиссии может меняться, т.е. для одной и той же клетки можно ожидать вспышки с несколько отличающимся фронтом спада. Такой вывод подтверждается данными проведенных ранее измерений.

Список литературы / References:

1. Токарев Ю.Н., Евстигнеев П.В., Машукова О.В. *Планктонные биолюминесцентные Мирового океана: видовое разнообразие, характеристики светоизлучения в норме и при антропогенном воздействии*. Н.Орианда, Симферополь, 2016, 340с. [Tokarev Yu.N., Evstigneev P.V., Mashukova O.V. *Plankton bioluminescents of the World ocean: species diversity, light emission characteristics under normal conditions and anthropogenic influence*. N.Orianda, Simferopol, 2016, 340p. (In Russ.)]
2. Eckert R. The wave form of luminescence emitted by *Noctiluca*. *J.Gen.Physiol.*, 1967, vol.50, pp. 2211-2233.
3. Eckert R., Sibaoka T. The Flash-Triggering Action Potential of the Luminescent Dinoflagellate *Noctiluca*. *J.Gen.Physiol.*, 1968, vol. 52, pp. 258-282.
4. Eckert R. Bioelectric Control of Bioluminescence in the Dinoflagellate *Noctiluca*. *Science*, 1965, vol.147, pp.1140-1145.
5. Nealson K.H., Arneson A.C., Huber M.E. Identification of marine organisms using kinetic and spectral properties of their bioluminescence. *Mar. Biol.*, 1986, vol.91, pp.77-83.
6. Shimomura O. Bioluminescence: chemical principles and methods. *World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.*, 2006, 494p.
7. Valiadi M., Iglesias-Rodriguez D. Understanding Bioluminescence in Dinoflagellates—How Far Have We Come? *Microorganisms*, 2013, vol.1, pp.3-25, doi:10.3390/microorganisms1010003.