

**МОДЕЛЬ ОДИНОЧНОЙ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ ВСПЫШКИ КЛЕТКИ *Noctiluca scintillans* С УЧЕТОМ БИОХИМИЧЕСКОЙ ОСНОВЫ ЕЕ СВЕЧЕНИЯ**

Евстигнеев В.П.<sup>1</sup>, Сахонь Е.Г.<sup>2</sup>, Лелеков А.С.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ

e-mail: vald\_e@rambler.ru,

<sup>2</sup>ФГБУН Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ

**Аннотация.** В работе представлен вариант модели одиночной биолюминесцентной вспышки *Noctiluca scintillans*, учитывающий биоэлектрический триггер световой эмиссии и биохимическую основу ее формирования. Предложена система дифференциальных уравнений, численное решение которой может быть использовано для получения физико-химических параметров процесса биолюминесценции и кинетических характеристик вспышки. В основе модели использована простейшая схема взаимодействия люминесцирующего белка люциферина и фермента люциферазы. Дополнительно учтена активизация ключевых компонент при распространении потенциала действия в тонком периферическом слое цитоплазмы клетки. Минимизация функции невязки проводилась в два этапа. На первом этапе осуществлялась аппроксимация экспоненциального участка вспышки на фронте спада интенсивности биолюминесценции, что позволило ввести дополнительное эмпирическое уравнение связи между параметрами модели. На втором – проводилась аппроксимация полной системы уравнений модели, причем один из оптимизационных параметров исключался за счет полученной на первом этапе эмпирической связи. Модель была апробирована на примере световых вспышек ноктилюки, отобранной 14 апреля 2011 года в прибрежной зоне Севастопольского региона.

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

*Noctiluca scintillans* **CELL SINGLE FLASH MODEL CONSIDERING BIOCHEMICAL BACKGROUND OF ITS LIGHT EMISSION**

Evstigneev V.P.<sup>1</sup>, Sakhon E.G.<sup>2</sup>, Lelekov A.S.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Sevastopol State University

Universitetskaya St., 33, Sevastopol, 299053, Russia

e-mail: vald\_e@rambler.ru

<sup>2</sup> A.O. Kovalevsky Institute of Marine Biological Research of RAS

Nakhimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia

**Abstract.** The present work reports the model of a single bioluminescent flash of *Noctiluca scintillans* cell considering bioelectrical trigger and biochemical background of light emission. A system of differential equations is suggested in order to obtain physicochemical parameters of bioluminescence and characteristics of the flash registered. A simple approach is put in the basis of model which involves luminescent protein luciferin to interact with luciferase enzyme. In addition, activation of the key compounds is taking into account provided by flash-triggering action potential propagation through thin peripheral layer of a cell cytoplasm. Minimization of discrepancy function was accomplished within two stages. At the first stage, an approximation of exponential part of bioluminescent flash decay was implemented in order to introduce empirical restraint on model parameters. At the second stage, an approximation of the full equations system was implemented bearing in mind empirical restraint applied to parameters on the previous stage. The model was tested using bioluminescence records of *N. scintillans* cells collected in Sevastopol region on April 14, 2011.

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

**Введение.**

Морская биолюминесценция (излучение световых импульсов живыми организмами) является одним из самых распространенных явлений в Мировом океане. Несмотря на отсутствие четкого представления о биологической роли этого эффекта, биолюминесценция используется в практике рыболовства, мореходства, других видов человеческой деятельности. Также потенциально высокая практическая значимость этого эффекта обусловлена тем, что светящиеся системы многих видов проявляют исключительно высокую чувствительность к некоторым токсическим загрязняющим веществам. Актуальность исследований биолюминесценции в этом направлении имеет неотъемлемый экологический аспект.

Биолюминесценция является сложным нелинейным процессом, изучение которого может проводиться с позиций молекулярной биофизики и биологии, биофизики возбудимых сред. Исследования биолюминесценции за последние десятилетия претерпели качественные изменения, в первую очередь связанные с прогрессом в области светорегистрирующих датчиков и вычислительной техники. Однако до сих пор степень изученности механизмов биолюминесценции разных видов светящихся считается не достаточной [1].

Одним из традиционных светоизлучающих организмов, люминесцентная активность которого подверглась всестороннему исследованию, является *Noctiluca scintillans*. Пики развития ноктилюки отмечаются весной (до

прогрева воды) и осенью. В разгар лета холодолюбивая ноктилюка опускается на глубину в более прохладные слои воды.

«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 билюминесцентной реакции как спонтанно, так и при стимуляции (механическая, электрическая и др.). Несмотря на это характер свечения этого биологического объекта до конца не изучен.

На рисунке 1 представлен типичный световой импульс *N.scintillans*. При инструментальной регистрации обработка светового сигнала проводится путем определения его энергетических и временных характеристик [2-4]. Характерной особенностью импульса ноктилюки является устойчивость его длительности (около 100 мс) и формы: крутой фронт подъема вспышки и относительно пологий фронт спада. Интенсивность вспышек на расстоянии 1 см от фотокатода умножителя составляет около  $0.1 \cdot 10^{-6}$  мкВт/см<sup>2</sup> поверхности фотокатода.

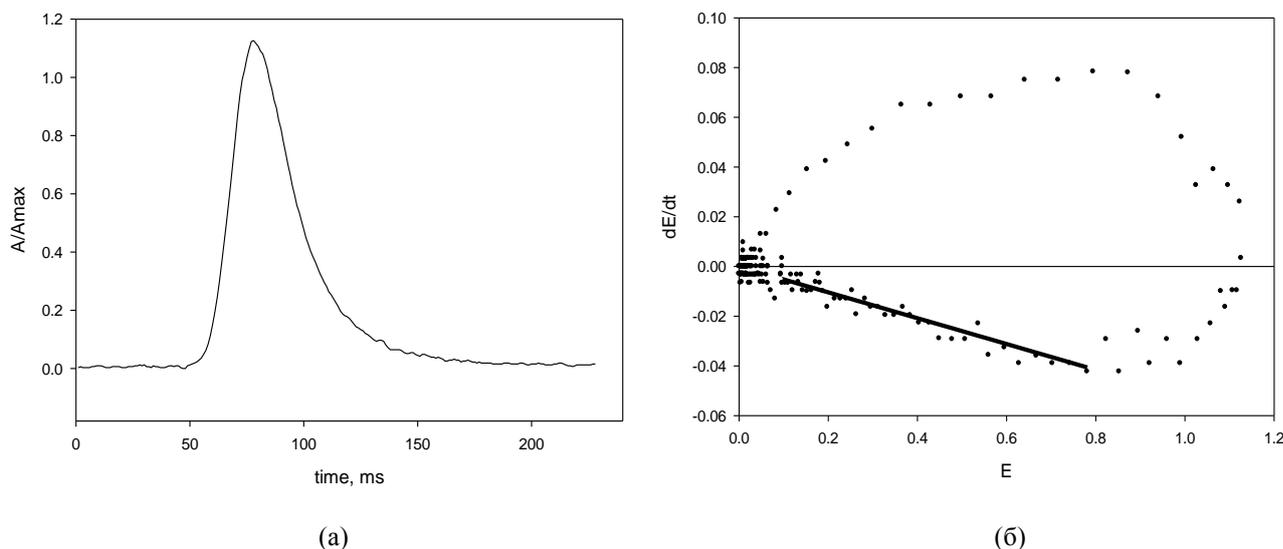


Рисунок 1 – Типичный световой импульс *Noctiluca scintillans* в пробе, отобранной 14 апреля 2011 г.: временная развертка импульса (а) и его представление на фазовой плоскости (б)

В большинстве работ по исследованию билюминесценции кинетические параметры вспышек используются в качестве индикаторов внутренних процессов, инициализирующих или модулирующих билюминесценцию организма. Редкие работы посвящены моделированию кинетики самой вспышки.

По-видимому, первое наиболее подробное описание кинетики билюминесцентной вспышки *N. scintillans* и вопросов ее моделирования было сделано Эккертом (см., например, [2]). Проведенный им подробный анализ билюминесценции *N.scintillans* позволил выделить основные физические механизмы распространения светового импульса. Однако дальнейшие исследования [1] показали, что важным этапом формирования билюминесцентного сигнала является протекающая в сцинтиллонах фотобиохимическая реакция люциферин-люцифераза.

#### Гипотеза о механизме вспышки.

Резюмируя результаты предметных исследований билюминесценции динофлагеллят за более чем 50 лет, сформулируем вкратце положения, которые могут лечь в основу модели кинетики вспышки для получения физических параметров ее формирования.

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 практически весь объем клетки *Noctiluca scintillans*. В первом приближении этот цитоплазматический слой можно представить в виде сфероида [2]. Регистрируемая стандартным методом билюминесцентная макровспышка является суммой микровспышек каждого из сцинтиллонов.

Эмиссия квантов света (в среднем  $10^5$  фотонов из одного сцинтиллона) происходит по принципу «все или ничего» в ответ на понижение показателя pH в цитоплазме с 8 до 6. Последнее связано с диффузией H<sup>+</sup> из вакуоли вследствие гиперполяризации ее мембраны и деполяризации перивакуолярной цитоплазмы – процессам, возникающим при раздражении организма извне [3]. Выброс протонов осуществляется через протонные каналы мембраны не повсеместно, а строго локализовано. Однако вследствие релаксационных процессов в месте раздражения мембраны формируется локальный потенциал действия FTP (flash-triggering potential), распространяющийся по периферическому слою цитоплазмы со скоростью 60 мкм/мс [4]. Вспышки органелл следуют за фронтом потенциала действия через 1-3 мс. Распространение потенциала действия (FTP) по сферической перивакуолярной цитоплазме от точки стимуляции осуществляется вдоль ее условного меридиана [2] (рис. 2). Длительность процесса распространения FTP по клетке оказывается существенно меньше типичной длительности макровспышки (100 мс) [2-4].

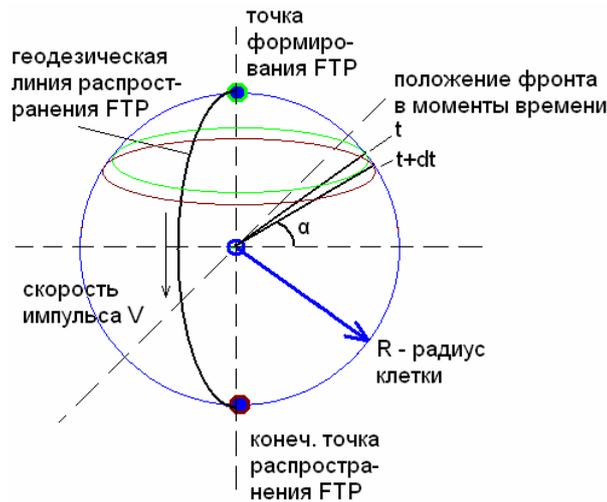


Рисунок 2 – Сфероид периферической цитоплазмы, в которой протекают процессы распространения FTP и светового

промежуточный комплекс;  $P^*$  – возбужденный люциферин;  $P$  – неактивный (окисленный) люциферин. В сущности (1) это реакция катализируемого окисления люциферина в уединенном сцинтиллоне, результатом чего является эмиссия квантов света. Хотя точные экспериментальные данные и абсолютное понимание биохимии процесса отсутствуют [5], в первом приближении можно считать, что такая хемилюминесцентная реакция регулируется только кинетикой фермент-субстратного взаимодействия. Тогда кинетикой непосредственного окисления возбужденной формы люциферина можно пренебречь, считая ее скорость высокой настолько, что квантовый выход этой реакции пропорционален количеству продукта  $P^*$ .

Следует отметить, что содержание субстрата, активного люциферина в уединенном сцинтиллоне является переменной величиной, которая, судя по характеру эмиссии света, изменяется в широких пределах от максимума до полного отсутствия. В этой связи в модели биолуминесцентной вспышки потребуется использовать полную систему дифференциальных уравнений для схемы (1) в отличие от классического приближения Михаелис-Ментен ( $S \gg E$ ).

#### Феноменологическая модель эмиссии света.

В соответствии с описанным выше механизмом предположим, что фронт потенциала действия перемещается вдоль геодезической линии сферы от точки стимуляции к противоположной точке с постоянной скоростью  $V$ . Также предположим, что сцинтиллоны однородно распределены по поверхности сфероида с некоторой плотностью  $\sigma$ . Тогда за каждый промежуток времени ( $t; t+dt$ ) фронт FTP инициирует фотобиохимическую реакцию в органеллах, количество которых  $dN$  будет пропорционально охватываемой фронтом площади  $dS$ :

$$dN = \sigma dS = 2\pi R^2 \sigma \sin \alpha d\alpha.$$

Вводя величину  $\omega$  угловой скорости перемещения FTP, получим:  $dN = 2\pi R^2 \sigma \sin \omega t \cdot \omega dt = a \omega \sin \omega t$ . Зная среднюю концентрацию люциферина и люциферазы в каждом сцинтиллоне, нетрудно пересчитать приращение числа сцинтиллонов  $dN$  в приращение концентрации свободного субстрата ( $a_s \omega \sin \omega t$ ) и фермента ( $a_E \omega \sin \omega t$ ). Записывая систему уравнений для схемы реакций (1) и дополняя ее слагаемыми, отражающими изменение величины концентрации взаимодействующих компонент вследствие распространения FTP, получим систему дифференциальных уравнений в безразмерном виде:

$$\begin{cases} \dot{x} = (K - \lambda + 2x)y - (1 - \cos 2\varphi\tau)x + \varphi \sin 2\varphi\tau \\ \dot{y} = (1 - \cos 2\varphi\tau)x - (x + K)y \end{cases}, \quad (2)$$

где  $\varepsilon = \frac{a_E}{a_S}$ ,  $\varphi = \frac{\omega}{2K_1 a_E}$ ,  $\tau = K_1 a_E t$ ,  $K = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1 a_S}$ ,  $\lambda = \frac{K_2}{K_1 a_S}$ ,  $x = \frac{[S]}{2a_S}$ ,  $y = \frac{[ES]}{2a_E}$ . После того как импульс

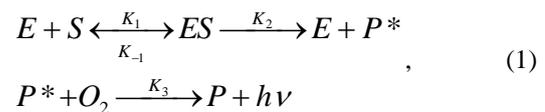
FTP достигнет противоположного полюса сферы ( $t > \pi/\omega$ ), эволюция световой эмиссии будет определяться сугубо биохимией процесса биолуминесценции. В системе (2) в этом случае члены, содержащие тригонометрические функции, исключаются.

Предполагая, что помимо FTP кинетика световой эмиссии определяется кинетикой фермент-субстратной реакции, а количество квантов света пропорционально содержанию продукта  $P^*$ , получим уравнение для интенсивности вспышки:

$$I = I_0 2a_E K_2 y,$$

где  $I_0$  – переходный коэффициент между интенсивностью фотоэмиссии и содержанием продукта  $P^*$ .

Объяснение кинетики светового импульса только закономерностью распространения FTP, очевидно, некорректно. Так экспериментально было доказано [2], что формы макровспышки клетки динофлагеллят (в том числе ноктилюки) и вспышки отдельно выделенного сцинтиллона совпадают. Помимо динамики процесса распространения потенциала действия FTP, при моделировании биолуминесценции следует учитывать кинетику фотобиохимической реакции, протекающей в сцинтиллонах. Важным этапом формирования представлений о механизме биолуминесценции стало [2] выделение люциферина и люциферазы, условной группы люминесцирующих белков и соответствующих ферментов, кинетика взаимодействия которых описывается известной фермент-субстратной реакцией:



где  $E$  – люцифераза;  $S$  – люциферин;  $ES$  –

возбужденный люциферин;

Аппроксимация теоретической кривой к эмпирическим данным должна проводиться в 2 этапа. В [4] было впервые показано, что спад световой эмиссии протекает по экспоненциальному закону. На фазовой плоскости биолюминесцентного импульса, экспоненциальный спад соответствует прямолинейному участку кривой как это показано на рисунке 1б. Согласно модели (2) угловой коэффициент этого участка определяется суммой двух констант  $K_1+K_2$ . Таким образом, установление на первом этапе величины углового коэффициента позволит исключить одну из констант из набора оптимизационных параметров. На втором этапе может быть проведен поиск оптимального набора  $(a_E, a_S, K_2, K_1, R)$  параметров модели с учетом эмпирической связи для  $K_1$ .

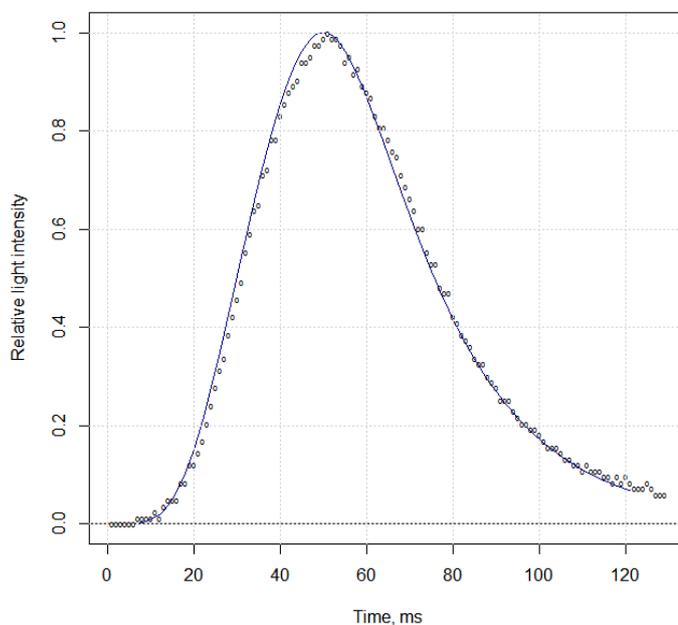


Рисунок 3 – Вспышка одиночной клетки *Noctiluca scintillans* по результатам *in vitro* измерений (точки) и теоретическая кривая (сплошная линия)

На основании предложенной модели (2) были полученные численные значения параметров одиночной биолюминесцентной вспышки клетки ноктилюки по данным регистрации фотоэмиссии в пробе, отобранной 14 апреля 2011 года в прибрежной зоне Севастопольского региона. На рисунке 3 представлен совместный ход интенсивностей световой эмиссии (отн.ед.) по данным натуральных измерений и теоретической модели. Несмотря на удовлетворительное совпадение кривых, получение надежной оценки параметров модели осложнено тем, что целевая функция задана неявно. В этой связи оценка ошибок параметров должна производиться непараметрическими методами. Также стоит отметить, что значения части параметров могут быть получены либо по измерениям непосредственно перед регистрацией биолюминесценции (средний радиус клетки  $R$ ), либо при проведении дополнительных экспериментов (константы взаимодействия). Это позволит сократить число неизвестных параметров до двух, что существенно повысит надежность оптимизационных процедур.

#### Выводы.

В работе предложен вариант феноменологической модели одиночной биолюминесцентной вспышки *Noctiluca scintillans*, инициируемой потенциалом действия при его распространении по почти сферической поверхности периферийного цитоплазматического слоя клетки. В основе модели лежит представление о фермент-субстратном окислении люциферина и, как следствие, эмиссии квантов света. Надежная оценка параметров модели по эмпирическим данным осложнена неявным видом целевой функции, что требует применения непараметрических методов оценивания и является предметом дальнейших исследований авторов.

#### Список литературы / References:

1. Shimomura O. Bioluminescence: chemical principles and methods. *World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.*, 2006, 494 p.
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. Valiadi M., Iglesias-Rodriguez D. Understanding Bioluminescence in Dinoflagellates – How Far Have We Come? *Microorganisms*, 2013, vol. 1, pp. 3-25.