

УДК 591.148.1:577.472(26)

В.П. Евстигнеев, мл. науч. сотрудник,

Л.В. Потопахин

Севастопольский национальный технический университет

ул. Университетская 33, г. Севастополь, Украина, 99053

E-mail: vald_e@rambler.ru

МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИНАМИКИ СВЕЧЕНИЯ ОТДЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ *NOCTILUCA SCINTILLANS* (Sur.)

*Выявлена роль потенциала действия в развитии процесса световой эмиссии с поверхности клетки *Noctiluca scintillans* (Sur.). Разработан теоретический подход к исследованию распространения потенциала действия вдоль мембраны клетки. Получено соотношение, описывающее колебание мембранного потенциала клетки *Noctiluca scintillans* (Sur.) в предположении сферичности ее поверхности.*

Ключевые слова: потенциал действия, биолюминесценция, *Noctiluca scintillans* (Sur.), динамика свечения

Введение. Морская биолюминесценция (свечение морских организмов) является одним из самых распространенных явлений в Мировом океане. Несмотря на отсутствие четкого представления о биологической роли этого эффекта, он обладает потенциально высокой практической значимостью, связанной с тем, что светящиеся системы многих видов проявляют исключительно высокую чувствительность к некоторым токсическим загрязняющим веществам. Актуальность подобных работ имеет неотъемлемый экологический аспект. Исследования биолюминесценции за последние десятилетия претерпели качественные изменения, в первую очередь, связанные с прогрессом в области светорегистрирующих датчиков и вычислительной техники.

В период 1983-2005 гг. экспериментальные исследования люминесцентной активности фитопланктонных организмов Черного моря, как критерия их функционального состояния и адаптационных возможностей, проводились на традиционном для этого региона модельном объекте – *Noctiluca scintillans* (Sur.) [1]. Это было связано, прежде всего, с тем, что у данного организма отсутствует фотосинтетическая система, наличие которой создает ряд методических трудностей при интерпретации результатов оценки биохемилюминесцентной активности на фоне работы биохимической системы фотосинтеза. Одной из особенностей светоизлучения культур перидиниевых водорослей (в частности, *Noctiluca scintillans* (Sur.)) является наличие низкоуровневого свечения (глоу), с трудом различаемого глазом и, предположительно, не связанного со вспышками, возникающими в результате механического взаимодействия клеток водорослей между собой и со стенками сосуда в лабораторных экспериментах. В работе [2], было показано, что в случае действия токсического агента такое низкоуровневое свечение появлялось всегда одновременно с контактом популяции с загрязняющим веществом.

Известно, что процесс биолюминесценции у перидиниевых водорослей связан с деятельностью специфических образований типа сцинциллонов, локализованных в приповерхностных слоях цитоплазмы [1,3]. Считается, что эмиссия квантов света происходит в ответ на протонный сдвиг, возникающий при снижении pH, а последнее происходит в момент диффузии катионов водорода из примембранных слоев в сцинциллоны. В свою очередь, указанная диффузия инициируется проходящим (пробегающим) потенциалом действия, возникающим при раздражении организма извне, что впервые было показано в работе [4]. Так в экспериментах по электрической стимуляции люминесценции ночесветки [3] было установлено, что потенциал действия триггирует люминесценцию ночесветки на уровне цитоплазматических органелл сцинциллонов. После нанесения локального электрического раздражения потенциал действия распространяется из места стимуляции по периферической цитоплазме со скоростью 60 мкм/с. Вспышки органелл следуют за локальным потенциалом действия через 1-3 мс и фронт световой эмиссии в клетке движется в том же направлении, что и потенциал действия. Сцинциллоны отвечают на этот потенциал по принципу «все или ничего». Каждая органелла дает микровспышку, состоящую в среднем из 10^5 фотонов. Регистрируемый с помощью обычной методики импульс ночесветки представляет собой сумму микровспышек.

Таким образом, результаты предыдущих исследований биолюминесценции ночесветки свидетельствуют о существовании однозначной связи между возникновением и распространением потенциала действия на мембране клетки и характеристиками и видом вспышки. Условно подобная связь может быть выражена соотношением вида

$$J = \int_S f(\varphi - \varphi_0) dS,$$

где J – интегральная светимость поверхности клетки; $\phi - \phi_0$ – отклонение мембранного потенциала от потенциала покоя; S – площадь поверхности клетки. Однако изучение динамики светимости клеток ночесветки невозможно без исследования особенностей распространения по поверхности ее мембраны потенциала действия, чему и посвящена данная работа.

Потенциал действия.

Термин «потенциал действия» был введен в связи с изучением явления распространения нервных импульсов, основные представления о процессе генерации которого были сформированы в работах А. Ходжкина, А. Хаксли и Б. Катцем.

Протоплазма многих клеток содержит в высокой концентрации K^+ и в относительно низкой концентрации Na^+ и Cl^- . Ионы K^+ внутри клетки свободны и не связаны с белками или другими крупными молекулами [5]. В состоянии покоя мембрана более проницаема для K^+ , чем для Na^+ . Вследствие диффузии K^+ наружу внутреннее содержимое клетки заряжено отрицательно по отношению к наружному раствору. Эта постоянная разность потенциалов – потенциал покоя.

Для описания изменений мембранного потенциала при возбуждении часто используют подход в виде эквивалентной электрической цепи (см. рисунок 1). Проводимость утечки введена для учета движения ионов, проходящих по каналам, которые не меняются при возбуждении мембраны. В соответствии со схемой мембранный потенциал, измеряемый на схеме между внутренней и наружной средой клетки, создается электродвижущими силами, связанными с равновесными потенциалами отдельных видов ионов. Ток в каждой из ветвей равен

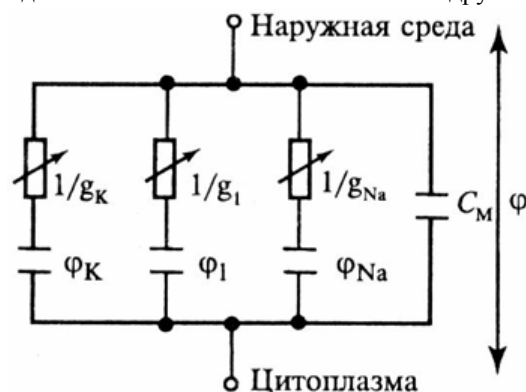


Рисунок 1 – Эквивалентная схема мембраны клетки (g_K, g_{Na}, g_l – проводимости для K^+ , Na^+ и утечки) [5]

$$I_i = g_i(\phi - \phi_i), \quad (1)$$

где g_i – проводимость мембраны для данного вида ионов, ϕ_i – равновесный потенциал данного вида ионов, а ϕ – общий потенциал на мембране. Очевидно, что при разомкнутой цепи и постоянном напряжении (состояние покоя мембраны) сумма токов на мембране равна нулю. Из этого можно получить следующее выражение для мембранного потенциала покоя:

$$\phi_0 = \frac{g_K \phi_K}{G} + \frac{g_{Na} \phi_{Na}}{G} + \frac{g_l \phi_l}{G}, \quad (2)$$

где $G = g_K + g_{Na} + g_l$ – суммарная проводимость мембраны.

Эквивалентная схема ионных проводимостей мембраны и основанное на ней уравнение (2) предполагают, что разные виды ионов проникают через клеточную мембрану по пространственно разделенным путям. Это соответствует современным представлениям о существовании отдельных типов ионных каналов, селективно проницаемых для Na^+ и K^+ [5].

В состоянии покоя ток через мембрану не течет. В случае если потенциал на мембране сместить от равновесного уровня в сторону деполяризации, то проницаемости Na^+ - и K^+ - каналов изменяются определенным образом от одного стационарного состояния к другому. В этом случае в каждом из параллельно соединенных участков текут токи, пропорциональные разности между равновесным потенциалом иона ϕ_i и поддерживаемым на мембране потенциалом (см. формулу (1)). Общий ток через мембрану $I_{общ}$ равен сумме емкостного тока и ионного тока:

$$I_{общ} = C_M \frac{d\phi}{dt} + I,$$

где C_M – мембранная емкость, $d\phi/dt$ – скорость изменения мембранного потенциала, $I = \sum I_i$ – трансмембранный ионный ток. С использованием формулы (1) и (2) выражение для трансмембранного ионного тока может быть преобразовано к виду:

$$I = \sum I_i = G(\phi - \phi_0). \quad (3)$$

Окончательно выражение для общего тока, проходящего через мембрану, примет вид:

$$I_{общ} = C_M \frac{d(\phi - \phi_0)}{dt} + G(\phi - \phi_0). \quad (4)$$

Результаты и обсуждение.

Распространение возбуждения связано с протеканием локальных токов между покоящимися и активными участками. Для простоты рассуждений примем, что внешняя поверхность клетки эквипотенциальна, т.е. внешняя среда хорошо проводит электрический ток. В области возникновения потенциала действия внутренняя часть подмембранного пространства заряжена положительно, а в соседних невозбужденных участках – отрицательно. В результате возникает локальный ток между возбужденными и покоящимися участками мембраны. Подобным образом возбуждение передается дальше. Следует отметить, что распространение импульса осуществляется в однонаправленном порядке, поскольку участки мембраны, через которых прошел потенциал действия, теряют на некоторое время способность к возбуждению – свойство, получившее название «рефрактерности».

Известно, что клетка ночесветки имеет практически шарообразную форму. Можно предположить, что процесс передачи потенциала действия протекает в подмембранном пространстве, представляющем собой сферическую оболочку. Будем считать активные и покоящиеся участки достаточно малыми, позволяющими исследовать законы распространения возбуждения в дифференциальной форме.

Рассмотрим процесс перераспределения зарядов на мембранной поверхности достаточной малой толщины. Предположим, что рассматриваемая клетка находится в большом объеме проводящей среды, что позволяет пренебречь наружным сопротивлением, а наружный потенциал считать постоянным. Исходя из общефизических соображений, запишем для единицы площади поверхности клетки следующую систему уравнений (закон Ома в дифференциальной форме и связь напряженности поля с потенциалом):

$$\begin{cases} \vec{j} = \sigma \vec{E} \\ \vec{E} = -\vec{\nabla} \varphi \end{cases}, \quad (5)$$

где $\vec{j}$ – плотность приповерхностного ионного тока, обуславливающего распространение импульса; $\vec{E}$ – напряженность поля в окрестности рассматриваемого участка; σ – проводимость вдоль поверхности мембраны; φ – потенциал мембраны в данном малом участке.

Запишем итоговое уравнение:

$$\vec{j} = -\sigma \vec{\nabla} \varphi. \quad (6)$$

Учитывая закон сохранения заряда, уравнение непрерывности в дифференциальной форме имеет вид:

$$\vec{\nabla} \vec{j} + \frac{\partial \rho}{\partial t} = 0, \quad (7)$$

где ρ – поверхностная плотность заряда. Подставляя (6) в соотношение (7) получим:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = \vec{\nabla}(\sigma \vec{\nabla} \varphi). \quad (8)$$

Однако следует учесть, что изменение количества заряда в рассматриваемом участке мембраны связано с его утечкой в наружную среду (мембранный ток). Как было показано выше, мембранный ток на данном участке мембраны состоит из емкостного тока мембраны и трансмембранного тока I , протекающего через мембрану и состоящего из парциальных ионных токов: натриевого, калиевого и тока утечки. Принимая емкость C из расчета на единицу площади поверхности клетки, можем записать следующее уравнение:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = C \frac{\partial \varphi}{\partial t} + I. \quad (9)$$

Сравнив (8) и (9), получим окончательное дифференциальное уравнение, описывающее изменение потенциала на мембране клетки:

$$\vec{\nabla}(\sigma \vec{\nabla} \varphi) = C \frac{\partial \varphi}{\partial t} + I. \quad (10)$$

Принимая во внимание эквивалентную схему возбудимой мембраны, обсуждаемую выше (см. рисунок 1), ионный ток может быть выражен формулой (4). Тогда окончательное уравнение импульса примет вид:

$$\vec{\nabla}(\sigma \vec{\nabla}(\varphi - \varphi_0)) = C_M \frac{\partial(\varphi - \varphi_0)}{\partial t} + G(\varphi - \varphi_0). \quad (11)$$

Представим φ как $\varphi = \varphi_0 + \omega$, где ω – отклонение потенциала мембраны от его значения в состоянии покоя. Тогда:

$$\vec{\nabla}(\sigma \vec{\nabla} \omega) = C \frac{\partial \omega}{\partial t} + G \omega. \quad (12)$$

В простейшем модельном приближении предположим, что константы данного дифференциального уравнения постоянны и не зависят от координат точки определения потенциала мембраны ($\sigma, C, G = \text{const}$). В соответствии с этим допущением перепишем (12) в виде:

$$\begin{cases} \frac{\partial \omega}{\partial t} = -D \Delta \omega + \alpha \omega \\ D = -\frac{\sigma}{C}, \quad \alpha = \frac{G}{C} \end{cases} \quad (13)$$

Данное дифференциальное уравнение является частным случаем нелинейных уравнений градиентного типа, к которым приводят многие задачи, включающие процессы переноса диффузионного типа [6].

Найдем закон распространения импульса потенциала действия для рассматриваемой системы. Положим $\omega = \omega(x, t)$, где $x = (x_1, x_2, x_3)$. Перепишем данное уравнение в виде

$$\begin{cases} \frac{\partial \omega}{\partial t} = L \omega \\ L = -D \Delta + \alpha \end{cases}, \quad (14)$$

которое является уравнением параболического типа. Предположим, что в начальный момент времени мембранный потенциал клетки выведен из состояния покоя, и его распределение по поверхности клетки может быть выражено уравнением вида:

$$\omega(x, 0) = \omega_0(x). \quad (15)$$

Не накладывая граничных условий, поиск решения задачи (14), (15) представляет собой задачу Коши. Для построения формального решения воспользуемся методом Фурье, следуя которому решение уравнения (14) ищется в виде произведения двух функций $T(t)$ и $X(x)$, каждая из которых зависит от одной переменной:

$$\omega(x, t) = T(t)X(x). \quad (16)$$

После подстановки (16) уравнение (14) распадается на два обыкновенных дифференциальных уравнения:

$$T' + \lambda T = 0, \quad (17)$$

$$DX'' - (\alpha + \lambda)X = 0, \quad (18)$$

где λ – некоторая постоянная.

Уравнение (17) решается элементарно:

$$T(t) = a e^{-\lambda t}, \quad a = T(0). \quad (19)$$

Вид решения позволяет сделать вывод об экспоненциальном затухании возбуждения мембранного потенциала со временем и о его стремлении приобрести значение, соответствующее состоянию покоя мембраны (при $\lambda > 0$).

В основе модельных представлений лежит предположение о шарообразности клетки *Noctiluca scintillans* (Sur.), что создает необходимость рассматривать потенциал действия, распространяющийся по сферической поверхности мембраны клетки. Таким образом, решение дифференциального уравнения (18) следует искать в форме функции сферических координат $\tilde{X}(\theta, \varphi)$, что приведет к преобразованию уравнения (18) в виде:

$$\begin{cases} \frac{1}{\sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \frac{\partial \tilde{X}}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{\sin^2 \theta} \frac{\partial^2 \tilde{X}}{\partial \varphi^2} + \mu \tilde{X} = 0 \\ \mu = -\frac{(\alpha + \lambda)}{D} r^2 \end{cases}, \quad (20)$$

где r – геометрический радиус клетки шарообразной формы.

Левая часть уравнения (20) представляет собой результат действия оператора Лежандра Λ [7] на функционал $\tilde{X}(\theta, \varphi)$:

$$\begin{cases} \Lambda \tilde{X} - \mu \tilde{X} = 0 \\ \Lambda = - \left\{ \frac{1}{\sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \frac{\partial}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{\sin^2 \theta} \frac{\partial^2}{\partial \varphi^2} \right\}. \end{cases} \quad (21)$$

Решение уравнения (21) имеет конечные и физически адекватные решения только при условии $\mu = l(l+1)$, $l = 0, 1, \dots$, из чего следует, что постоянная λ принимает дискретные значения:

$$\lambda_l = - \left(\frac{D}{r^2} l(l+1) + \alpha \right). \quad (22)$$

Каждому числу λ_l соответствует совокупность $(2l+1)$ решений уравнения Лежандра (21), являющаяся сферической функцией вида

$$\tilde{X}_l(\theta, \varphi) = \sum_{m=-l}^l a_l^{(m)} \tilde{X}_l^m(\theta, \varphi), \quad (23)$$

где $a_l^{(m)}$ – произвольные коэффициенты, а $\tilde{X}_l^m(\theta, \varphi)$ представляет собой m -е решение уравнения (21), которое единственным и однозначным способом может быть выражено через присоединенные функции Лежандра $P_l^{|m|}(\cos \theta)$ [7]:

$$\tilde{X}_l^m(\theta, \varphi) = P_l^{|m|}(\cos \theta) e^{im\varphi}, \quad m = 0, \pm 1, \dots, \pm l. \quad (24)$$

Для построения окончательного выражения для функции $\omega(\theta, \varphi, t)$, являющейся решением дифференциального уравнения (14), следует оговорить вид коэффициентов $a_l^{(m)}$. Можно показать [7], что сферические функции $\tilde{X}_l^m(\theta, \varphi)$ образуют полную и ортогональную систему на единичной сфере S^2 в пространстве R^3 , причем норма функции составляет:

$$\|\tilde{X}_l^m(\theta, \varphi)\|^2 = \frac{4\pi}{2l+1} \frac{(l+|m|)!}{(l-|m|)!}. \quad (25)$$

Полнота ортогональной системы сферических функций, в свою очередь, означает, что всякая функция $f(\theta, \varphi)$ на рассматриваемой сферической поверхности разлагается в ряд Фурье по этим функциям. Таким образом, функция $\omega_0(\theta, \varphi)$ начального отклонения потенциала мембраны от его значения в состоянии покоя может быть представлена в виде

$$\omega_0(\theta, \varphi) = \sum_{l=0}^{\infty} \tilde{X}_l(\theta, \varphi) = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l a_l^{(m)} \tilde{X}_l^m(\theta, \varphi),$$

где $a_l^{(m)}$ – в данном случае играют роль коэффициентов Фурье, которые в соответствии с (24) и (25) могут быть вычислены по формуле:

$$a_l^{(m)} = \frac{2l+1}{4\pi} \frac{(l-|m|)!}{(l+|m|)!} \int_0^{\pi} \int_0^{2\pi} \omega_0(\theta, \varphi) P_l^{|m|}(\cos \theta) e^{im\varphi} \sin \theta d\theta d\varphi. \quad (26)$$

С учетом (16), (19), (22)–(24) и (26) запишем окончательное выражение для функции отклонения потенциала мембраны от его значения в состоянии покоя $\omega(\theta, \varphi, t)$:

$$\begin{aligned} \omega(\theta, \varphi, t) &= \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l a_l^{(m)} e^{\left(\frac{D}{r^2} l(l+1) + \alpha \right) t} P_l^{|m|}(\cos \theta) e^{im\varphi} \\ a_l^{(m)} &= \frac{2l+1}{4\pi} \frac{(l-|m|)!}{(l+|m|)!} \int_0^{\pi} \int_0^{2\pi} \omega_0(\theta, \varphi) P_l^{|m|}(\cos \theta) e^{im\varphi} \sin \theta d\theta d\varphi \end{aligned} \quad (27)$$

Выводы.

Таким образом, получено общее решение уравнения колебаний мембранного потенциала клетки при установлении начального профиля потенциала мембраны вдоль ее поверхности и из условия сферичности клетки *Noctiluca scintillans* (Sur.). Полученное аналитическое выражение (27) требует в дальнейшем более глубокого анализа на предмет его адекватности реальному процессу распространения возбуждения потенциала мембраны и, как следствие, свечения клетки ночесветки, равно как более детальное исследование механизмов распространения фронта световой эмиссии в клетке вслед за

распространением потенциала действия. Однако выражение (27) в настоящем виде может быть использовано для моделирования свечения идентичных организмов, а также является основой для исследования согласованной спонтанной биолюминесценции популяций *Noctiluca scintillans* (Sur.) в присутствии в среде загрязняющих веществ.

Библиографический список

1. Микроводоросли Черного моря: проблемы сохранения биоразнообразия и биотехнологического использования / Под ред. Ю.Н. Токарева, З.З.Финенко, Н.В. Шадрин // НАН Украины, Институт биологии южных морей. — Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2008. — 454 с.
2. Евстигнеев В.П. Самопроизвольное свечение черноморской ночесветки в норме и при патологии / В.П. Евстигнеев, П.В. Евстигнеев // Альгология. — 2005. — Т. 15. — № 3. — С. 271–279.
3. Евстигнеев П.В. Биолюминесценция морских копепод / П.В.Евстигнеев, Э.П. Битюков. — К.: Наук. думка, 1990. — 144 с.
4. Eckert R. The wave form of luminescence emitted by *Noctiluca* / R. Eckert // J. Gen. Physiol. — 1967. — V. 50, № 9. — P. 2211–2237.
5. Рубин А.Б. Биофизика. Т.2: Биофизика клеточных процессов: учебник / А.Б. Рубин. — [2-е изд.]. — М.: Книжный дом «Университет», 2000. — 468 с.
6. Карлов Н.В. Колебания, волны, структуры / Н.В. Карлов, Н.А. Кириченко. — М.: Физматлит, 2003. — 496 с.
7. Владимиров В.С. Уравнения математической физики / В.С. Владимиров, В.В. Жаринов. — М.: Физматлит, 2003. — 400 с.

Поступила в редакцію 02.03.2009 г.