

УДК: 577.344

Редуцированная модель фотосистемы II для оценки характеристик фотосинтетического аппарата по данным индукции флуоресценции

Т. Ю. Плюснина^{1,a}, Е. Н. Воронова¹, В. Н. Гольцев², С. И. Погосян¹,
О. В. Яковлева¹, Г. Ю. Ризниченко¹, А. Б. Рубин¹

¹ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Биологический ф-т, каф. биофизики, Россия, 119992, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12.

² Софийский университет им. Св. Климента Охридского, биологический ф-т, каф. биофизики и радиобиологии, Болгария, 1164, г. София, бул. Драгана Цанкова, 8.
E-mail: ^a plusn@yandex.ru

Получено 9 октября 2012 г.,
после доработки 3 декабря 2012 г.

Рассматривается подход для анализа некоторых биологических систем большой размерности, для которых справедливы предположения о квазиравновесных стадиях. Подход позволяет редуцировать детальные модели большой размерности и получить упрощенные модели, имеющие аналитическое решение. Это дает возможность достаточно точно воспроизводить экспериментальные кривые. Рассматриваемый подход был применен к детальной модели первичных процессов фотосинтеза в реакционном центре фотосистемы II. Упрощенная модель фотосистемы II хорошо описывает экспериментальные кривые индукции флуоресценции для высших и низших растений, полученные при разных интенсивностях света. Выведенные соотношения между переменными и параметрами детальной и упрощенной моделей, позволили использовать полученные оценки параметров упрощенной модели для описания динамики различных состояний фотосистемы II детальной модели.

Ключевые слова: фотосистема II, кривая индукции флуоресценции, редукция модели

Reduced model of photosystem II and its use to evaluate the photosynthetic apparatus characteristics according to the fluorescence induction curves

T. Yu. Plyusnina^{1,a}, E. N. Voronova¹, V. N. Goltzev², S. I. Pogosyan¹, O. V. Yakovleva¹,
G. Yu. Riznichenko¹, A. B. Rubin¹

¹ M.V. Lomonosov Moscow State University, Biologigal Faculty, Biophysical Department
Leninski Gory, 1-12, 119992, Moscow, Russia

² St. Kliment Ohridski University of Sofia, Department of Biophysics and Radiobiology, Faculty of Biology,
8, Dragan Tzankov Boulevard, 1164 Sofia, Bulgaria

Abstract. — The approach for the analysis of some large-scale biological systems, on the base of quasi-equilibrium stages is proposed. The approach allows us to reduce the detailed large-scaled models and obtain the simplified model with an analytical solution. This makes it possible to reproduce the experimental curves with a good accuracy. This approach has been applied to a detailed model of the primary processes of photosynthesis in the reaction center of photosystem II. The resulting simplified model of photosystem II describes the experimental fluorescence induction curves for higher and lower plants, obtained under different light intensities. Derived relationships between variables and parameters of detailed and simplified models, allow us to use parameters of simplified model to describe the dynamics of various states of photosystem II detailed model.

Keywords: photosystem II, fluorescence induction curves, model reduction

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2012, vol. 4, no. 3, pp. 943–958 (Russian).

Работа поддержана грантом РФФИ 11-04-01268а и ФЦП 80-77 2012-021-12-000-2003-004.

© 2012 Татьяна Юрьевна Плюснина, Елена Николаевна Воронова, Василий Николаевич Гольцев, Сергей Иосифович Погосян, Ольга Валентиновна Яковлева, Галина Юрьевна Ризниченко, Андоей Борисович Рубин.

Введение

Моделирование биологических систем на современном этапе развития биологии является нетривиальной задачей. С одной стороны, многие биологические объекты на самых разных уровнях организации изучены достаточно подробно, что с учетом развития компьютерных технологий позволяет строить детальные модели, включающие большое число элементов и связей между ними. С другой стороны, непосредственные экспериментальные измерения часто не позволяют количественно оценить параметры взаимодействия между всеми элементами системы. Как следствие, в детальных математических моделях, описывающие сложные системы, всегда присутствует неоднозначность как в учете всех элементов системы, так и в оценке параметров, характеризующих взаимодействия между элементами. Поскольку биологические системы являются, как правило, нелинейными системами, то такая неоднозначность, проявляющаяся даже в небольшом отклонении значений параметров, может привести к значительному изменению решения модели.

Существуют различные подходы для преодоления трудностей, связанных с моделированием сложных систем. Большинство подходов связано с упрощением сложных систем. Учитывается иерархия времен в организации биологических процессов, квазиравновесие и квазистационарность одних процессов по отношению к другим. Все это позволяет выделить так называемые параметры порядка — те структуры и процессы, которые определяют видимый эффект. Выделение параметров порядка позволяет редуцировать модель, значительно уменьшив число переменных модели, что облегчает поиск решения, соответствующего экспериментальным зависимостям. Однако при этом многие детали описываемого явления теряются. Оптимальным подходом к моделированию многих биологических систем было бы создание таких моделей, которые после упрощения исходной системы и описания экспериментальных данных позволяли бы вернуться к детальному описанию, используя найденные в упрощенных моделях параметры.

Одним из примеров хорошо изученной сложной системы являются первичные процессы фотосинтеза, протекающие в хлоропластах зеленых растений на мембране тилакоидов. Попадание квантов света в антенну реакционного центра фотосистемы II (ФС II) вызывает возбуждение пигмента реакционного центра (P680), разделение зарядов и последующий перенос электрона, в результате которого происходит образование окислительно-восстановительного эквивалента NADPH, который далее используется в темновых реакциях фотосинтеза при синтезе сахаров.

При попадании квантов света в антенну реакционных центров часть энергии высвечивается в виде флуоресценции. Флуоресценция является процессом, конкурирующим с фотохимическим переносом электронов, поэтому экспериментально измеренные кривые индукции флуоресценции дают информацию об активности ФС II, которая может быть использована в экологическом мониторинге. Кривая индукции флуоресценции представляет собой, как правило, трехфазную кривую, отложенную в логарифмическом масштабе времени и называемую в соответствии с отображаемыми фазами — OJIP (рис.1). Интенсивность флуоресценции изменяется от некоего исходного уровня F_0 (после темновой адаптации растения) до максимального уровня F_m (при насыщающей интенсивности света). Фазы кривой OJ, JI и IP соответствуют временам 0–2.5, 0.3–20 и 20–300 мс и отражают этапы восстановления первичного хинона Q_A . Максимальный уровень F_m соответствует полному восстановлению Q_A . Для количественного описания кривых индукции флуоресценции часто используется феноменологический подход, состоящий в разложении кривых на сумму трех экспоненциальных членов, соответствующим трем описанным выше стадиям. Для описания конкретного механизма переноса электронов используется математическое моделирование.

Существующие многочисленные математические модели первичных процессов фотосинтеза характеризуются разным уровнем сложности. Модели, разработанные в [Strasser et al., 2001, Lazar 2003, Zhu et al., 2005, Belyaeva et al., 2011], подробно описывают возможные со-

стояния ФС II и переходы между ними. Схемы реакций и, соответственно, системы уравнений включают от 30 до 50 переменных. Модели отличаются детализацией различных стадий и подходами к расчету интенсивности флуоресценции. Их преимуществом является использование всего экспериментально накопленного материала об элементарных стадиях и соответствующим им экспериментально измеренным константам скоростей. Однако, как указывалось выше, часто не все параметры таких моделей могут быть оценены из эксперимента, а большое число подгонных параметров приводит к неоднозначности решений.

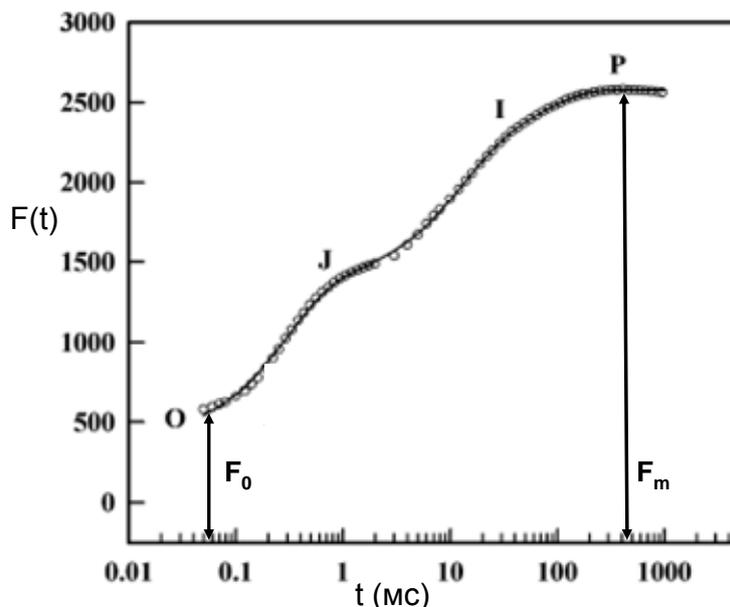


Рис. 1. Типичная кривая световой индукции флуоресценции. Адаптировано из [Boisvert et al., 2006]

Упрощенные модели переноса электронов в ФС II [Baake, Schloder, 1992, Goltsev, Yordanov, 1997, Chervnev et al., 2006, Vredenberg, Prasil, 2009], учитывающие только основные стадии переноса электронов, хорошо описывают экспериментальные индукционные кривые, но не позволяют оценить вклад отдельных элементарных стадий в общий процесс. Кроме того, их параметры не имеют ясного физического (биологического) смысла.

В данной работе на примере модели ФС II предлагается подход, объединяющий возможности как упрощенных моделей, так и детальных. Существование иерархии времен первичных процессов фотосинтеза, протекающих на временных интервалах от пикосекунд до сотен секунд, позволяет редуцировать исходную детальную систему. Поскольку кривая индукции флуоресценции может быть аппроксимирована суммой трех экспоненциальных функций, которые можно представить как решение системы дифференциальных уравнений, то для максимально редуцированной модели достаточно трех линейных дифференциальных уравнений.

В задачу данной работы входило получить максимально редуцированную модель, количественно описывающую экспериментальные кривые индукции флуоресценции; используя полученные при фитировании величины параметров редуцированной модели и соотношения между параметрами редуцированной и детальной моделей, оценить константы реакций исходной детальной системы для клеток водорослей и листьев фасоли при различных условиях освещения.

Математическая модель

Рассмотрим последовательность процессов переноса электронов в реакционном центре ФС II (рис. 2).

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.

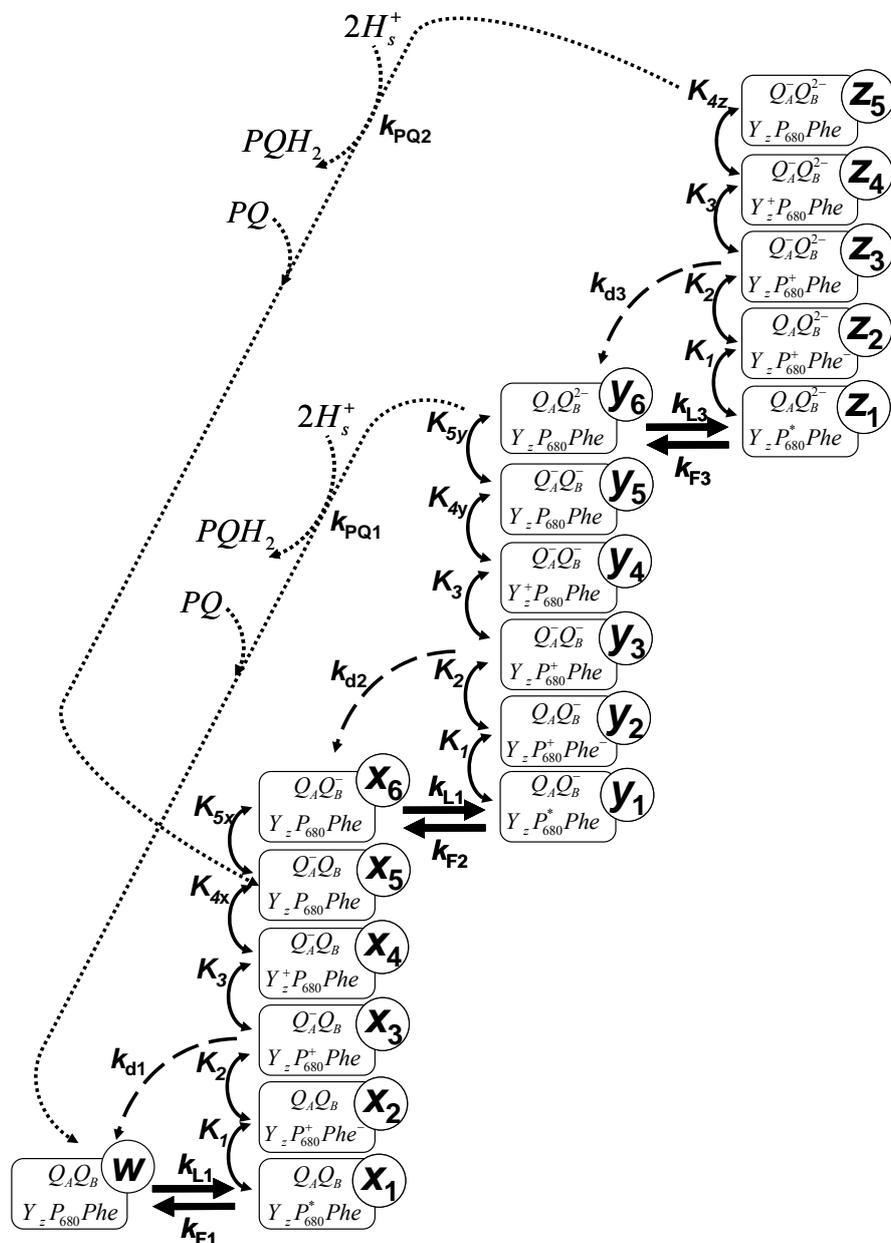


Рис. 2. Схема первичных процессов переноса электронов в реакционном центре ФС II. Прямоугольники – состояния реакционного центра ФС II с различной степенью восстановления входящих в него переносчиков. P_{680} — пигмент хлорофилла. Phe — феофетин, первичный акцептор электрона. Q_A и Q_B соответственно 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

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 вто-

ричным 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 ФС II 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.

Рассмотрим быстрые процессы, приведенные на рис. 2. Будем предполагать, что эти процессы находятся в квазиравновесии по отношению к световым реакциям, поскольку скорость световых стадий, определяемая частотой поглощения квантов света, существенно меньше скорости переноса электронов между комплексами.

Реакция K_1 : разделение зарядов. Состояния x_1, y_1, z_1 , в которых пигмент P_{680} находится в возбужденном состоянии, переходят в состояния x_2, y_2, z_2 , при этом на Phe образуется отрицательный заряд, на P_{680} — положительный. Реакция K_2 : электрон с феофетина Phe переносится на Q_A , восстанавливая его и образуя состояния x_3, y_3, z_3 . Реакция K_3 : пигмент P_{680} восстанавливается, принимая электрон от тирозина Y_z , образуются состояния x_4, y_4, z_4 . Реакция K_4 : Y_z в свою очередь восстанавливается, принимая электроны от воды посредством кислород-выделяющего комплекса, возникают состояния x_5, y_5, z_5 . Реакция K_5 : перенос электрона с хинона Q_A на хинон Q_B , образуются состояния x_6, y_6 .

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-} .

Учтем возможность безызлучательной рекомбинации зарядов с хинонных компонентов на P_{680} в виде реакций k_{di} ($i=1 \dots 3$).

Наличие квази-равновесных состояний позволяет 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 (см. Приложение), получим редуцированную модель и соответствующую ей редуцированную схему для новых переменных:

Система уравнений, соответствующая редуцированной схеме на рис. 3, с учетом закона сохранения ($w + x + y + z = w_0$) имеет вид

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= -(q_{L1} + q_{F1} + q_{L2} + q_{d1})x + (-q_{L1} + q_{F1} + q_{d2})y + (-q_{L1} + q_{PQ2})z + q_{L1}w_0, \\ \frac{dy}{dt} &= q_{L2}x - (q_{F2} + q_{L3} + q_{2d} + q_{PQ1})y + (q_{F3} + q_{d3})z, \\ \frac{dz}{dt} &= q_{L3}y - (q_{F3} + q_{d3} + q_{PQ2})z, \end{aligned}$$

где w_0 — суммарная концентрация всех реакционных центров.

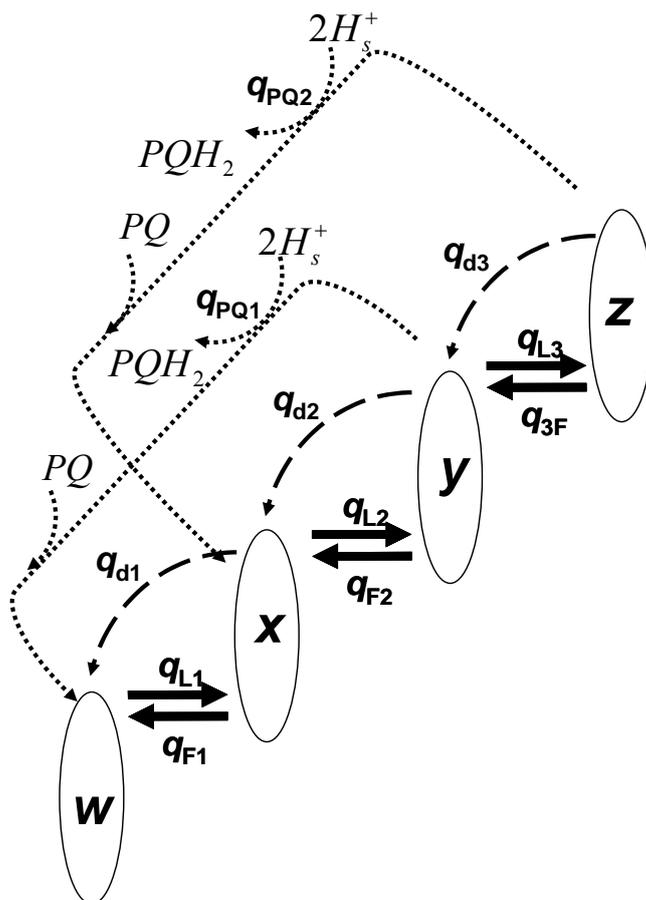


Рис. 3. Редуцированная схема первичных процессов фотосинтеза.

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, $i = 1, 2$

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 (см. Приложение).

Флуоресценцию будем вычислять как сумму всех флуоресцирующих состояний:

$$F = x_1 + y_1 + z_1.$$

В новых переменных редуцированной модели флуоресценция будет описываться 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 (см. Приложение).

Таким образом, получена редуцированная модель переноса электронов в ФС II, состоящая из трех дифференциальных уравнений. Система является линейной, поэтому ее решение может быть представлено в виде суммы трех экспонент, что позволяет использовать полученное решение для описания трехфазных экспериментальных кривых.

Оценка параметров модели

Большинство констант детальной модели измерены экспериментально, их величины хорошо известны. Будем предполагать, что 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 четырех квантов света в систему реакционного центра происходит донирование электронов от воды в четыре 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, должны отличаться 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 будут отличаться по величине.

Оценка значений констант, используемых в исходной детальной модели, по литературным данным приведена в таблице 1.

Таблица 1. Значения констант, используемых в модели

Стадия	Обозначения параметров, используемые в детальной модели	Значения констант, приведенные в литературе		Ссылки
		Константы скорости	Константы равновесия	
Возбуждение пигментного комплекса	k_L	4–5.5 мс^{-1}		Lazar 2003
Флуоресценция	k_F	0.0002 мс^{-1}		Belyaeva 2008
Разделение зарядов (открытые РЦ)	K_1		100	Rabinovich and Govindjee, 1969
Разделение зарядов (закрытые РЦ)	K_2		10^8	Roelofs 1992
Восстановление P680	K_3		200	Renger 2001
Восстановление тирозина Yz	K_{4x} K_{4y} K_{4z}		29 3 3	Brettel 1984
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 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 можно зафиксировать в соответствии с величинами, приведенными в литературе. В численном счете для описания экспериментальных кривых будем фитировать световую константу k_L , константы безызлучательных переходов k_d и константы реакции обмена пластохинона с Q_B -сайтом k_{PQ} .

Экспериментальные данные

Получение кривых индукции флуоресценции для клеток водоросли

Объектом исследования служила микробиологически чистая культура одноклеточной зеленой водоросли *Chlorella sp.* Водоросли выращивали в накопительном режиме на 20 % среде Тамия [Кузнецов и др., 1964]. Культивирование проводили в колбах объемом 250 мл при температуре 25 °С и постоянном освещении при плотности мощности 12 Вт/м² в области ФАР светодиодами источниками дневного света при постоянном перемешивании. Измерения параметров флуоресценции хлорофилла а проводили на вторые сутки на стадии экспоненциального роста.

Параметры флуоресценции и кривые индукции флуоресценции хлорофилла а в суспензии водорослей регистрировали на приборе «МЕГА-25», созданном на кафедре биофизики биофака МГУ им. М. В. Ломоносова [Погосян и др., 2009]. Измерения проводили после 10-минутной темновой адаптации суспензии водорослей при интенсивности возбуждающего света 1000, 2000 и 4000 мкмоль квантов/(м²с).

Получение кривых индукции флуоресценции для листьев фасоли

Исследования проводились также на листьях молодых растений фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*) сорта «Черная старозагорская». Растения выращивали в пласмассовых вегетационных ящиках на почвенно-торфенной смеси в культивационных помещениях при температуре 22–23 °С и освещении белым люминесцентным светом интенсивностью 250 мкмоль квантов/(м²с) при суточном режиме освещения/темнота 12/12. После появления первой пары тройных листьев растения декапитировали удалением апикальной доминанты по методике, описанной ранее [Yordanov et al., 2008]. В экспериментах использовали первичные листья 25–30-дневных растений фасоли.

Индукционные кривые переменной флуоресценции хлорофилла измеряли с помощью флуориметра М-РЕА 2 (Multifunctional Plant Efficiency Analyzer), описанного ранее [Strasser et al., 2010]. Индукционные кривые регистрировали на первичных листьях целого растения, адаптированного к темноте в течение 1 часа. Интенсивность возбуждающего света при измерении кривых устанавливали на 1000, 2000 и 4000 мкмоль квантов/(м²с).

Результаты численных экспериментов

Численные эксперименты проводились с помощью программы DBSolve Optimum [Gizatkulov et al., 2010], которая позволяет получать решения систем дифференциальных уравнений, а также проводить фитирование модельных решений по экспериментальным точкам.

Для верификации модели были использованы кривые индукции флуоресценции, полученные при действии света интенсивностью $I = 1000, 2000, 4000$ мкмоль квантов/м²с на листья фасоли и клетки водоросли *Chlorella*. 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 изменяются от 0 до 1. Нулевые начальные условия для переменных указывают на то, что при адаптации к темноте и в листьях и в клетках все реакционные центры находятся в открытом состоянии. Значения эффективных констант модели q_{Li} , q_{di} , q_{POi} определялись путем фитирования численного решения модели по экспериментальным точкам. Результаты фитирования представлены на рис. 4.

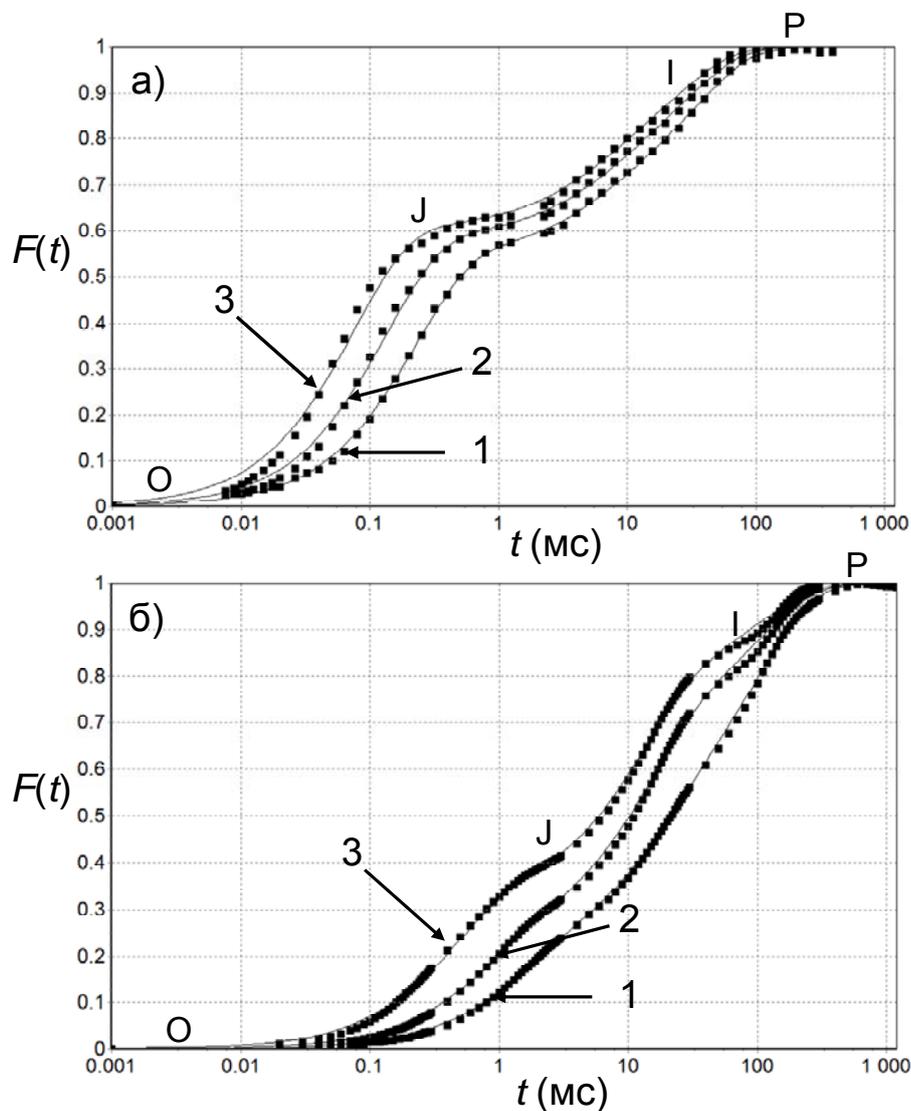


Рис. 4. Кривые индукции флуоресценции, полученные с помощью редуцированной модели:

(а) для клеток водорослей, (б) для листьев фасоли.

Точки — экспериментальные данные. Непрерывные линии — модельные кривые.

Кривые 1, 2, 3 соответствуют интенсивностям света $I = 1000, 2000, 4000$ мкмоль квантов/(m^2c) соответственно. Параметры модели, при которых наблюдается наилучшее совпадение модельных и экспериментальных кривых, приведены в таблице 2

Используя полученные при фитировании эффективные константы, а также соотношения (9), связывающие эффективные константы с константами элементарных стадий исходной детальной модели (см. Приложение), мы получили значения параметров исходной модели (таблица 2).

Таблица 2. Значения элементарных констант детальной модели (рис. 2), рассчитанные по соотношениям (9) (см. Приложение)

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

Полученные значения параметров были использованы для описания динамики переменных исходной детальной модели.

На рис. 5. представлена динамика состояний с разной степенью восстановленности хинонных акцепторов.

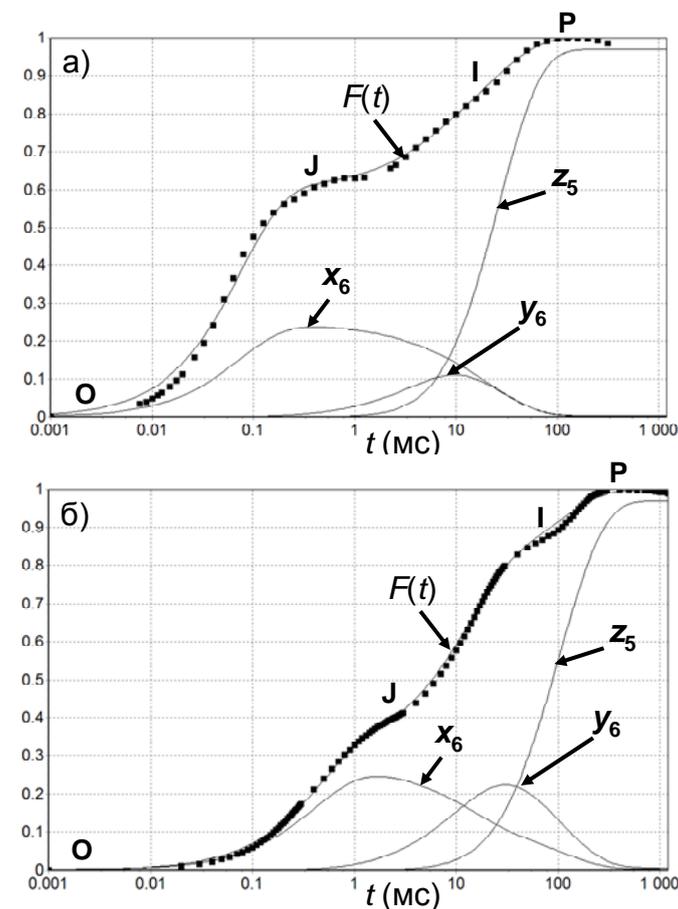


Рис. 5. Динамика переменных исходной детальной модели: (а) для клеток водорослей, (б) для листьев фасоли. Точки – экспериментальные данные для интенсивности света $I = 4000$ мкмоль/м²с. x_6, y_6 и z_5 – состояния с одним, двумя и тремя электронами на хинонных акцепторах (схема на рис. 2). Флуоресценция $F(t)$ описана как сумма возбужденных состояний x_1, y_1, z_1

Из приведенных на рис. 4 и 5 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 полной модели, используя их выражения через переменные упрощенной модели.

Обсуждение результатов

В данной работе предложен подход для редукции детальных моделей переноса электронов в ФС II, позволяющий использовать преимущества как редуцированной модели, так и исходной полной модели благодаря выведенным соотношениям между переменными и параметрами полной и редуцированной моделей.

Исходно была рассмотрена детальная модель, описывающая 18 различных состояний ФС II и переходы между ними. На основании существующей иерархии времен в системе было сделано предположение, что реакции переноса электрона находятся в квази-равновесном состоянии по отношению к световым стадиям. Это позволило провести редукцию полной модели и получить систему трех линейных дифференциальных уравнений, в которой переменными являются суммы состояний, несущих одинаковое количество электронов. Полученная система уравнений имеет аналитическое решение, представляющее собой сумму трех экспонент. Это дает принципиальную возможность описывать экспериментальные кривые индукции флуоресценции с помощью редуцированной модели с той же степенью точности, что и при непосредственном разложении кривых на три экспоненты, применяемом при обычном анализе кривых индукции флуоресценции.

Полученная редуцированная модель включает в качестве эффективных констант сочетания всех констант исходной полной модели. Фиксируя константы элементарных стадий полной модели, величины которых хорошо известны из литературных данных, можно определить те константы полной модели, которые не могут быть очень точно оценены из экспериментов. Например, эффективная константа обмена с Q_B -сайтом имеет вид:

$q_{PQ1} = k_{PQ1} \frac{K_{5y} \cdot K_{4y} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1}{1 + K_1 + K_2 \cdot K_1 + K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 + K_{4y} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 + K_{5y} \cdot K_{4y} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1}$ и включает элементарную константу обмена с Q_B -сайтом k_{PQ1} исходной полной модели, а также константы равновесия K_i . Фиксируя значения констант равновесия, известные из экспериментальных данных (таблица 1), можно рассчитать константу обмена с Q_B -сайтом k_{PQ1} по значению q_{PQ1} , полученному в результате фитирования.

Как видно из рис. 4 модельные кривые достаточно хорошо описывают экспериментальные данные для листьев фасоли и клеток водоросли *Chlorella*. Однако заметно, что при увеличении интенсивности возбуждающего света совпадение модельных и экспериментальных кривых становится немного хуже. На начальном участке индукционной кривой OJ для клеток водоросли модельная кривая смещена вверх относительно экспериментальных точек. Для листьев фасоли небольшое отклонение модельной кривой наблюдается на конечном участке IP. Возможно, это объясняется тем, что при большой интенсивности света на форму индукционной кривой начинают оказывать влияние процессы нефотохимического тушения и суммы трех экспонент уже недостаточно для описания формы кривой.

В результате фитирования редуцированной модели и пересчета эффективных констант были определены константы детальной модели: световые константы k_{Li} , константы безызлучательных переходов k_{di} , константы обмена с Q_B -сайтом k_{PQi} (таблица 2). Сравнение световых констант k_{Li} , полученных для клеток водоросли и листьев фасоли, показало, что для клеток водоросли световая константа примерно в 7 раз выше, чем для листьев фасоли. Возможным объяснением различия в световых константах для листьев фасоли и клеток водоросли является

влияние оптической плотности на характер индукционных кривых. Препараты водорослей представляют собой растворы с достаточно низкой оптической плотностью, тогда как препараты листьев являются объектом с высокой оптической плотностью, что могло бы вызвать сдвиг кривых индукции флуоресценции.

Выражения, связывающие переменные полной и упрощенной моделей и полученные при фитировании экспериментальных кривых константы позволили найти численные решения для переменных полной модели, соответствующие разным экспериментальным условиям и разным организмам. В частности была получена динамика состояний с одним, двумя и тремя электронами на хинонных акцепторах – x_6 , y_6 и z_5 для клеток водорослей и листьев фасоли при интенсивности света $I = 4000$ мкмоль/м²с (рис. 5). Результаты качественно совпадают с результатами, полученными в детальных моделях [Lazar 2003, Strasser, Stirbet, 2001] для аналогичных состояний и позволяют оценить вклад каждого состояния в общую кривую индукции флуоресценции, при этом кривая индукции флуоресценции в нашей модели описывается количественно. Видно, что первая фаза ОJ индукционной кривой обусловлена максимумом состояний с одним электроном x_6 , вторая фаза II – состояниями с двумя электронами y_6 . Максимальный уровень кривой $F(t)$ близок максимальному уровню кривой состояний с тремя электронами z_5 , что говорит о почти полном восстановлении ФС II при этой интенсивности света. Максимумы кривых x_6 и y_6 для листьев фасоли находятся примерно на одном уровне, тогда как для водорослей максимум y_6 значительно ниже, чем x_6 . Этим, по-видимому, объясняется то, что фаза II у водорослей выражена гораздо слабее, чем у листьев.

Рассмотренный подход к редукции детальной модели процессов переноса электронов в ФС II позволяет достаточно быстро обработать большое число экспериментальных кривых с помощью редуцированной модели и получить сравнительные оценки процессов в полной модели ФС II, как для разных условий эксперимента, так и для разных видов растительных организмов.

Список литературы

- Кузнецов Е. Д., Владимирова М. Г. Железо как фактор, лимитирующий рост хлореллы на среде Тамия // Физиология растений. 1964. Т.11. Вып. 4. С. 615–619.
- 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.
- Baake E., Schloder J. P. Modelling the fast fluorescence rise of photosynthesis // Bulletin of Mathematical Biology. 1992. V. 54. P. 999–1021.
- Belyaeva N. E., Schmitt F.-J., Steffen R., Paschenko V. Z., Riznichenko G. Yu, Chemeris Yu. K., Renger G., Rubin A. B. PS II 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 // Photosynth. Res. 2008. V. 98. P. 105–119.
- 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. V. 103. P. 188–195.
- Boisvert S., Joly D., Carpentier R. Quantitative analysis of the experimental O–J–I–P chlorophyll fluorescence induction kinetics Apparent activation energy and origin of each kinetic step // FEBS Journal. 2006. V. 273. P. 4770–4777.
- Brettel K., Schlodder E., Witt, H. T. Nanosecond reduction kinetics of photooxidized chlorophyll-aII (P-680) in single fleshes as a probe for the electron pathway, H⁺-release and charge accumulation in the O₂-evolving complex // Biochim. Biophys. Acta. 1984. V. 766. P. 403–415.

- 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 // *Экологично инженерство и опазване на околната среда (Ecological Engereeng and Environment protection)*. 2006. V. 5. P. 19–29.
- Crofts A. R., Wraight C. A.* The electrochemical domain of photosynthesis // *Biochim. Biophys. Acta*. 1983. V. 726. P. 149–185.
- 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 Systems Biology*. 2010. V. 4. P. 109.
- Goltsev V., Yordanov I.* Mathematical model of prompt and delayed chlorophyll fluorescence induction kinetics // *Photosynthetica*. 1997. V. 33(3–4). P. 571–586.
- 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. V. 220. P. 469–503.
- Rabinovich E., Govindjee.* In: *Photosynthesis*, New York: Interscience Publishers Inc., John Wiley. 1969. P. 197–215.
- 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.
- Renger G.* Photosynthetic water oxidation to molecular oxygen: apparatus and mechanism // *Biochim. Biophys. Acta*. 2001. V. 1503. P. 210–228.
- Renger G., Renger T.* Photosystem II: the machinery of photosynthetic water splitting // *Photosynth. Res.* 2008. V. 98. P. 53–80.
- Roelofs T. A., Lee C. H., Holzwarth A. R.* Global target analysis of picosecond chlorophyll fluorescence kinetic from pea chloroplasts // *Biophys J.* 1992. V. 61. P. 1147–1163.
- 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. V. 44, N. 9.
- 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. V. 56. P. 451–461.
- Strasser R. J., Tsimilli-Michael M., Qiang S., Goltsev V.* Simultaneous *in vivo* recording of prompt and delayed fluorescence and 820 nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. V. 1797. P. 1313–1326.
- Vredenberg W., Prasil O.* Modeling of Chlorophyll a Fluorescence Kinetics in Plant Cells: Derivation of a Descriptive Algorithm // *Photosynthesis in silico: Understanding Complexity from Molecules to Ecosystems* / Ed. Laisk A., Nedbal L. and Govindjee. 2009. P. 125–149.
- Yordanov I., Goltsev V., Stefanov D., Chernev P., Zaharieva I., Kirova M., Gecheva V., Strasser R. J.* Preservation of PS II Electron Transport from Senescence-Induced Inactivation in Primary Leaves after Decapitation and Defoliation of Bean Plants // *J. Plant Physiol.* 2008. V. 165. P. 1954–1963.
- 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. V. 223. P. 114–133.

Приложение

Для реакционной схемы, представленной на рис. 2, можно записать систему уравнений:

$$\begin{aligned} \dot{w} &= -V_{L1} + V_{d1} + V_{PQ1}, \\ \dot{x}_1 &= V_{L1} - V_{1x}, & \dot{y}_1 &= V_{L2} - V_{1y}, & \dot{z}_1 &= V_{L3} - V_{1z}, \\ \dot{x}_2 &= V_{1x} - V_{2x}, & \dot{y}_2 &= V_{1y} - V_{2y}, & \dot{z}_2 &= V_{1z} - V_{2z}, \\ \dot{x}_3 &= V_{2x} - V_{3x} - V_{d1}, & \dot{y}_3 &= V_{2y} - V_{3y} - V_{d2}, & \dot{z}_3 &= V_{2z} - V_{3z} - V_{d3}, \\ \dot{x}_4 &= V_{3x} - V_{4x}, & \dot{y}_4 &= V_{3y} - V_{4y}, & \dot{z}_4 &= V_{3z} - V_{4z}, \\ \dot{x}_5 &= V_{4x} - V_{5x} + V_{PQ2}, & \dot{y}_5 &= V_{4y} - V_{5y}, & \dot{z}_5 &= V_{4z} - V_{PQ2}, \\ \dot{x}_6 &= V_{5x} - V_{L2} + V_{d2}, & \dot{y}_6 &= V_{5y} - V_{L3} - V_{PQ1} + V_{d3}, \end{aligned} \quad (1)$$

где скорости реакций выражаются как

$$\begin{aligned} V_{L1} &= k_{L1}w - k_{F1}x_1, & V_{d1} &= k_{d1}x_3, & V_{PQ1} &= k_{PQ1}y_6, \\ V_{L2} &= k_{L2}x_6 - k_{F2}y_1, & V_{d2} &= k_{d2}y_3, & V_{PQ2} &= k_{PQ2}z_5, \\ V_{L3} &= k_{L3}y_6 - k_{F3}z_1, & V_{d3} &= k_{d3}z_3, \end{aligned} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} V_{1x} &= k_1x_1 - k_{-1}x_2, & V_{1y} &= k_1y_1 - k_{-1}y_2, & V_{1z} &= k_1z_1 - k_{-1}z_2, \\ V_{2x} &= k_2x_2 - k_{-2}x_3, & V_{2y} &= k_2y_2 - k_{-2}y_3, & V_{2z} &= k_2z_2 - k_{-2}z_3, \\ V_{3x} &= k_3x_3 - k_{-3}x_4, & V_{3y} &= k_3y_3 - k_{-3}y_4, & V_{3z} &= k_3z_3 - k_{-3}z_4, \\ V_{4x} &= k_4x_4 - k_{-4}x_5, & V_{4y} &= k_4y_4 - k_{-4}y_5, & V_{4z} &= k_4z_4 - k_{-4}z_5, \\ V_{5x} &= k_5x_5 - k_{-5}x_6, & V_{5y} &= k_5y_5 - k_{-5}y_6, \end{aligned}$$

Введем новые переменные: $x = \sum_{i=1}^6 x_i$, $y = \sum_{i=1}^6 y_i$, $z = \sum_{i=1}^5 z_i$.

В новых переменных система примет вид

$$\begin{aligned} \dot{w} &= -V_{L1} + V_{d1} + V_{PQ1}, \\ \dot{x} &= V_{L1} - V_{L2} - V_{d1} + V_{d2} + V_{PQ2}, \\ \dot{y} &= V_{L2} - V_{L3} - V_{d2} + V_{d3} - V_{PQ1}, \\ \dot{z} &= V_{L3} - V_{d3} - V_{PQ2}. \end{aligned} \quad (3)$$

Запишем реакции, находящиеся в квазиравновесии:

$$\begin{aligned} x_2 &= K_1 \cdot x_1, \\ x_3 &= K_2 \cdot x_2 = K_2 \cdot K_1 \cdot x_1, \\ x_4 &= K_3 \cdot x_3 = K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 \cdot x_1, \\ x_5 &= K_{4x} \cdot x_4 = K_{4x} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 \cdot x_1, \\ x_6 &= K_{5x} \cdot x_5 = K_{5x} \cdot K_{4x} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 \cdot x_1, \\ y_2 &= K_1 \cdot y_1, \\ y_3 &= K_2 \cdot y_2 = K_2 \cdot K_1 \cdot y_1, \\ y_4 &= K_3 \cdot y_3 = K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 \cdot y_1, \end{aligned} \quad (4)$$

$$\begin{aligned}
 y_5 &= K_{4y} \cdot y_4 = K_{4y} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 \cdot y_1, \\
 y_6 &= K_{5y} \cdot y_5 = K_{5y} \cdot K_{4y} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 \cdot y_1, \\
 z_2 &= K_1 \cdot z_1, \\
 z_3 &= K_2 \cdot z_2 = K_2 \cdot K_1 \cdot z_1, \\
 z_4 &= K_3 \cdot z_3 = K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 \cdot z_1, \\
 z_5 &= K_{4z} \cdot z_4 = K_{4z} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 \cdot z_1.
 \end{aligned}$$

Переменные исходной модели будут выражаться через новые переменные следующим образом:

$$\begin{aligned}
 x_1 &= \frac{x}{D_x}, \quad x_2 = \frac{K_1 \cdot x}{D_x}, \quad x_3 = \frac{K_2 \cdot K_1 \cdot x}{D_x}, \quad x_4 = \frac{K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 \cdot x}{D_x}, \\
 x_5 &= \frac{K_{4x} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 \cdot x}{D_x}, \quad x_6 = \frac{K_{5x} \cdot K_{4x} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 \cdot x}{D_x}, \\
 y_1 &= \frac{y}{D_y}, \quad y_2 = \frac{K_1 \cdot y}{D_y}, \quad y_3 = \frac{K_2 \cdot K_1 \cdot y}{D_y}, \quad y_4 = \frac{K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 \cdot y}{D_y}, \\
 y_5 &= \frac{K_{4y} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 \cdot y}{D_y}, \quad y_6 = \frac{K_{5y} \cdot K_{4y} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 \cdot y}{D_y}, \\
 z_1 &= \frac{z}{D_z}, \quad z_2 = \frac{K_1 \cdot z}{D_z}, \quad z_3 = \frac{K_2 \cdot K_1 \cdot z}{D_z}, \quad z_4 = \frac{K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 \cdot z}{D_z}, \quad z_5 = \frac{K_{4z} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 \cdot z}{D_z},
 \end{aligned} \tag{5}$$

где

$$\begin{aligned}
 D_x &= 1 + K_1 + K_2 \cdot K_1 + K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 + K_{4x} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 + K_{5x} \cdot K_{4x} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1, \\
 D_y &= 1 + K_1 + K_2 \cdot K_1 + K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 + K_{4y} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 + K_{5y} \cdot K_{4y} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1, \\
 D_z &= 1 + K_1 + K_2 \cdot K_1 + K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 + K_{4z} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1.
 \end{aligned}$$

Скорости реакций через новые переменные можно записать как

$$\begin{aligned}
 V_{L1} &= k_{L1}w - \frac{k_{F1}}{D_x}x = q_{L1}w - q_{F1}x, \\
 V_{L2} &= k_{L2} \frac{K_{5x} \cdot K_{4x} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1}{D_x}x - \frac{k_{F2}}{D_y}y = q_{L2}x - q_{F2}y, \\
 V_{L3} &= k_{L3} \frac{K_{5y} \cdot K_{4y} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1}{D_y}y - \frac{k_{F1}}{D_z}z = q_{L3}y - q_{F3}z, \\
 V_{d1} &= k_{d1}x_3 = k_{d1} \frac{K_2 \cdot K_1}{D_x}x = q_{d1}x, \\
 V_{d2} &= k_{d2}y_3 = k_{d2} \frac{K_2 \cdot K_1}{D_y}y = q_{d2}y, \\
 V_{d3} &= k_{d3}z_3 = k_{d3} \frac{K_2 \cdot K_1}{D_z}z = q_{d3}z, \\
 V_{PQ1} &= k_{PQ1} \frac{K_{5y} \cdot K_{4y} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1}{D_y}y = q_{PQ1}y, \\
 V_{PQ2} &= k_{PQ} \frac{K_{4z} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1}{D_z}z = q_{PQ2}z.
 \end{aligned} \tag{6}$$

Систему уравнений через новые переменные можно записать следующим образом:

$$\begin{aligned}\frac{dw}{dt} &= -(q_{L1}w - q_{F1}x) + q_{d1}x + q_{PQ1}y, \\ \frac{dx}{dt} &= (q_{L1}w - q_{F1}x) - (q_{L2}x - q_{F2}y) - q_{d1}x + q_{d2}y + q_{PQ2}z, \\ \frac{dy}{dt} &= (q_{L2}x - q_{F2}y) - (q_{L3}y - q_{F3}z) - q_{d2}y + q_{d3}z - q_{PQ1}y, \\ \frac{dz}{dt} &= (q_{L3}y - q_{F3}z) - q_{d3}z - q_{PQ2}z.\end{aligned}\quad (7)$$

В системе существует закон сохранения

$$w + x + y + z = w_0,$$

где w_0 — суммарная концентрация всех реакционных центров.

Окончательно, с учетом закона сохранения, система уравнений примет вид

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= -(q_{L1} + q_{F1} + q_{L2} + q_{d1})x + (-q_{L1} + q_{F2} + q_{d2})y + (-q_{L1} + q_{PQ2})z + q_{L1}w_0, \\ \frac{dy}{dt} &= q_{L2}x - (q_{F2} + q_{L3} + q_{d2} + q_{PQ1})y + (q_{F3} + q_{d3})z, \\ \frac{dz}{dt} &= q_{L3}y - (q_{F3} + q_{d3} + q_{PQ2})z,\end{aligned}\quad (8)$$

где выражения для новых констант через исходные константы имеют вид

$$\begin{aligned}q_{L1} &= k_{L1}, \\ q_{L2} &= k_{L2} \frac{K_{5x} \cdot K_{4x} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1}{1 + K_1 + K_2 \cdot K_1 + K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 + K_{4x} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 + K_{5x} \cdot K_{4x} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1}, \\ q_{L3} &= k_{L3} \frac{K_{5y} \cdot K_{4y} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1}{1 + K_1 + K_2 \cdot K_1 + K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 + K_{4y} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 + K_{5y} \cdot K_{4y} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1}, \\ q_{F1} &= \frac{k_{F1}}{1 + K_1 + K_2 \cdot K_1 + K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 + K_{4x} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 + K_{5x} \cdot K_{4x} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1}, \\ q_{F2} &= \frac{k_{F2}}{1 + K_1 + K_2 \cdot K_1 + K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 + K_{4y} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 + K_{5y} \cdot K_{4y} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1}, \\ q_{F3} &= \frac{k_{F3}}{1 + K_1 + K_2 \cdot K_1 + K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 + K_{4z} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1}, \\ q_{d1} &= k_{d1} \frac{K_2 \cdot K_1}{1 + K_1 + K_2 \cdot K_1 + K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 + K_{4x} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 + K_{5x} \cdot K_{4x} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1}, \\ q_{d2} &= k_{d2} \frac{K_2 \cdot K_1}{1 + K_1 + K_2 \cdot K_1 + K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 + K_{4y} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 + K_{5y} \cdot K_{4y} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1}, \\ q_{d3} &= k_{d3} \frac{K_2 \cdot K_1}{1 + K_1 + K_2 \cdot K_1 + K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 + K_{4z} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1}, \\ q_{PQ1} &= k_{PQ1} \frac{K_{5y} \cdot K_{4y} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1}{1 + K_1 + K_2 \cdot K_1 + K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 + K_{4y} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 + K_{5y} \cdot K_{4y} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1}, \\ q_{PQ2} &= k_{PQ2} \frac{K_{4z} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1}{1 + K_1 + K_2 \cdot K_1 + K_3 \cdot K_2 \cdot K_1 + K_{4z} \cdot K_3 \cdot K_2 \cdot K_1}.\end{aligned}\quad (9)$$