## БИОФИЗИКА И МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА

# Кластеризация рецепторов к инозитолтрифосфату определяет форму пика осцилляций кальция в цитозоле тромбоцита

Ф. А. Балабин,<sup>1, *a*</sup> Д. С. Морозова,<sup>2</sup> А. С. Майоров,<sup>1, 3, 4</sup>

А.А. Мартьянов,<sup>1,3,4</sup> М.А. Пантелеев,<sup>1,3,4</sup> А.Н. Свешникова<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup> Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН. Россия, 119991, Москва, ул. Косыгина 4.

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины.

Россия, 119991, Москва, Ломоносовский пр-кт, д. 27, стр. 1.

<sup>3</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет.

Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2.

<sup>4</sup> Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Д. Рогачева. Россия, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, д. 1.

Статья поступила 11.11.2017, принята к публикации 08.02.2018.

Безъядерные клетки крови — тромбоциты — должны обладать способностью за одну секунду реагировать на внешний стимул. Эта способность обеспечивается кальциевой сигнализацией — процессом передачи сигнала внутри клетки посредством повышения концентрации ионов кальция в цитозоле за счет их выхода из эндоплазматического ретикулума через канал-рецептор к инозитолтрифосфату (ИФЗР). Как и во многих других клетках, повышение концентрации кальция в цитозоле клетки происходит не монотонно, а в виде осцилляций. В настоящей работе теоретически и экспериментально исследуются закономерности развития этих осцилляций. Для наблюдения динамики концентрации кальция в тромбоците используется микроскопия полного внутреннего отражения для клеток, иммобилизованных на фибриногене и загруженных чувствительной к кальцию флуоресцентной меткой Fura-2. Для описания процесса развития осцилляций применяется модифицированная с учетом параметров тромбоцита математическая модель пары ИФЗР—АТФаза из работы [15]. Результаты работы показали, что кальциевые осцилляции в тромбоците обладают характерной формой пика, которая может быть описана теоретически только введением поправок в математическую модель, физический смысл которых состоит в кооперативной активации ИФЗР.

Ключевые слова: тромбоциты крови, внутриклеточная сигнализация, тромбин, инозитолтрифосфат, кальциевая сигнализация, математическое моделирование, флуоресцентная микроскопия. УДК: 577.31, 577.359, 577.325. PACS: 87.10.Ed, 87.16.Xa, 87.64.kv.

## введение

Тромбоциты — безъядерные форменные элементы крови диаметром 2–5 мкм и толщиной 0.5 мкм, образующиеся из мегакариоцитов. Тромбоциты сохраняют свои форму и размеры в течение 7–10 дней, если они не вовлечены в работу системы гемостаза — процесса образования тромбов. Помимо выполнения защитной функции для поврежденного эндотелия сосудов (путем образования тромбоцитарной пробки), при патологической активации эти клетки могут также являться причиной нарушения целостности сосудистой стенки, вызывать тромбозы, тромботические инсульты, а при недостатке активации — геморрагии [1].

Тромбоциты активируются как при контакте с компонентами межклеточного матрикса (при повреждении эндотелия), так и под действием растворимых активаторов (АДФ, адреналин, серотонин, тромбин и др.). Это запускает внутриклеточный каскад реакций, включающий сигнализацию, проводимую G-белками, синтез вторичных мессенджеров, высвобождение кальция из внутриклеточных хранилищ в цитозоль. Ответы тромбоцита на внешний стимул состоят в возникновении способности к адгезии и агрегации, секреции гранул, изменении цитоскелета и, как следствие, формы клетки с дисковидной до сферической. Молекулярный механизм развития многих ответов остается неясным, так как задействует несколько сигнальных каскадов, а изучение функционирования тромбоцитов в условиях тромбообразования в сосуде осложнено одновременным появлением нескольких активаторов и спонтанности высвобождения вторичных активаторов из тромбоцитарных гранул [2].

Большинство агонистов действует на рецепторы, связанные с G-белками на поверхности тромбоцита, что ведет к активации фосфолипазы С (ФЛС, в тромбоцитах человека преобладает фосфолипаза-С [3]), которая гидролизует фосфоинозитид-4,5-бисфосфат (PIP2) до инозитол-3-фосфата (ИФЗ) и 1,2-диацилглицерола (ДАГ). ИФЗ способствует высвобождению ионов кальция из внутриклеточных компартментов (в первую очередь эндоплазматического ретикулума (ЭПР)), а ДАГ способствует входу кальция из внеклеточного пространства. Это ведет к активации тромбоцита [4, 5]. Как показали исследования кальциевой сигнализации в одиночных клетках. повышение концентрации кальция при активации тромбоцита происходит не равномерно, а в виде осцилляций [6, 7]. Осцилляции и волны кальция наблюдались ранее во многих ядерных клетках, где резкий спад концентрации кальция обеспечивается работой АТФазы, расположенной на внутренней мембране и закачивающей кальций в ЭПР и SERCA (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase) (рис. 1). При этом для ядерных клеток показано наличие кластеров ИФЗР, обеспечивающих

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> E-mail: fa.balabin@physics.msu.ru





Рис. 1. Схема кальциевой сигнализации в тромбоците [9]. Тромбин активирует рецептор PAR1 рецептор (protease-activated receptor), являющийся ассоциированным с G-белком рецептором, преимущественно активирующим G-белок типа «q». Связанная с GTP α субъединица G-белка диффундирует к ФЛС и активирует ее. ФЛС катализирует образование растворимого ИФЗ, который является активатором рецепторов-каналов для кальция в мембране эндоплазматического ретикулума ИФЗР. Низкая концентрация кальция в цитозоле поддерживается кальциевыми АТФазами SERCA. В системе существует множество обратных связей, обозначенных пунктирными стрелками. Кроме активации ФЛС высокими концентрациями кальция в цитозоле также изображена активация высокой концентрацией кальция ИФЗК (ИФЗ-киназы) — фермента, снижающего концентрацию ИФЗ в цитозоле

отдельные спайки [8]. В то время как в существующих математических моделях осцилляций концентрации кальция в тромбоците [4, 9–11] SERCA также рассматривается как парный к ИФЗР канал, обеспечивающий колебания, кластеры ИФЗР считались для тромбоцита не столь существенными. Однако последние результаты исследований говорят о том, что размер области влияния одного кластера сравним с размером тромбоцита [12], поэтому кластеризации ИФЗ-рецепторов в тромбоците должно быть уделено внимание.

Именно кальциевая сигнализация вызывает ответ тромбоцита на агонисты рецепторов уже через несколько секунд. В наших предыдущих работах мы показали, что частота этих осцилляций может кодировать силу активатора [9] и эти осцилляции могут интегрироваться митохондриями [4, 6]. Снижение концентрации кальция в ЭПР ведет к активации системы восполнения клеточных хранилищ — открытию Orail, кальциевого канала в плазматической мембране. При достаточной частоте осцилляций кальция в цитозоле происходит его накопление в матриксе митохондрий и их коллапс, что ведет к клеточной гибели [13].

Таким образом, осцилляции концентрации кальция играют ключевую роль в передаче сигнала внутри тромбоцита, но их экспериментальное наблюдение представляет проблему в связи с малыми размерами тромбоцита и его чувствительностью к любым манипуляциям. Именно поэтому возникает необходимость в использовании компьютерных моделей для лучшего понимания и предсказания биохимических процессов и вызывающих их возникновение рецепторов в тромбоците.

Настоящая работа посвящена уточнению молекулярных механизмов, отвечающих за развитие осцилляций концентрации кальция при активации тромбоцитов. С этой целью было проведено измерение флуоресценции кальций-связывающего флуорофора Fura-2 в цитозоле тромбоцита методом микроскопии полного внутреннего отражения при активации различными агонистами. Для описания полученных данных была построена математическая модель системы ИФ3P—SERCA и теоретически показано, что наблюдаемая в эксперименте характерная форма пика кальция может быть объяснена только образованием кластера ИФ3P.

## 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

## 1.1. Материалы

Следующие материалы были получены из источников, указанных в скобках: Fura-2 AM (Molecular probes, Юджин, штат Орегон, США.) АДФ (Ренам, Москва), SFLLRN (синтезирован по заказу в ИБОХ РАН, Москва), остальные реагенты были поставлены компанией Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, штат Миссури, США).

#### 1.2. Выделение тромбоцитов

Эксперименты проводились с кровью здоровых доноров (18–35 лет). Были получены письменные разрешения доноров на врачебное вмешательство согласно Хельсинкской декларации. Забор крови проводился в вакуумные пробирки с 3.8% цитрата натрия. Процедура получения отмытых тромбоцитов аналогична описанной в работе [11]. Вкратце для получения богатой тромбоцитами плазмы проводилось центрифугирование в течение 8 мин при 100*g*. Для получение отмытых тромбоцитов проводилось повторное центрифугирование 5 мин 400g при pH 6.5. Дальнейшее исследование тромбоцитов проводилось в буфере A (150 мM NaCl, 2.7 мM KCl, 1 мM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 мM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 мM HEPES, 5 мМ глюкозы, 0.5% бычий сывороточный альбумин, pH 7.3). Выделение тромбоцитов и все дальнейшие эксперименты проводились при комнатной температуре.

#### 1.3. Постановка эксперимента

Для загрузки тромбоцитов кальциевым флуорофором проводилась инкубация богатой тромбоцитами плазмы с 2 мкМ Fura-2 AM и 2 МЕ/мл апиразы в течение 45 мин при комнатной температуре, после этого не вошедшая краска отмывалась путем центрифугирования, тромбоциты ресуспендировались в буфере А до плазменной концентрации. Для измерения динамики флуоресценции флуорофора тромбоциты иммобилизовались на фибриногене, как описано в работе [6]. Смена растворов проводилась с использованием проточных камер, схема которых представлена на рис. 2. Для нанесения фибриногена покровные стекла замачивались в 70%-м водном растворе этанола на 30 мин, высушивались и очищались в камере плазменной чистки. Сразу же после очистки на каждое стекло наносилось 10 мкл фибриногена в концентрации 1 мг/мл. Затем стекла инкубировались в водяной бане в течение часа. Остатки фибриногена смывались деионизированной водой, а стекла высушивались.

#### 1.4. Наблюдение активации тромбоцитов

Наблюдение активации клеток проводилось на микроскопе Nikon Eclipse TI-E. При работе на микроскопе смена окружения клеток проводилась путем откачивания перистальтическим насосом жидкости из проточной камеры. Посадка клеток регистрировалась микроскопией дифференциального интерференционного контраста. Возбуждение флуоресценции проводилось лазером 405 нм, направленным под углом 55–65°,



Рис. 2. Трехмерная модель проточной камеры. Проточная камера состоит из пяти деталей: предметное стекло  $24 \times 70$  мм с двумя отверстиями, просверленными на расстоянии 18 мм друг от друга, две силиконовые трубки диаметром 3 мм с просветом 1.5 мм, вклеенные в предметное стекло при помощи термоклея, покровное стекло  $24 \times 24$  мм с предварительно нанесенным на него фибриногеном и слой двусторонней клейкой ленты с прорезью между покровным и предметным стеклами. Смена растворов в проточной камере обеспечивается перистальтическим насосом, герметично подсоединяемым к одной из трубок

обеспечивающим режим полного внутреннего отражения. Регистрация флуоресценции проводилась фильтром 510-550 нм. Смена растворов в каждом эксперименте проводилась в следующей последовательности: буфер А, буфер А с добавлением 2 мМ хлорида кальция, буфер А с добавлением 2 мМ хлорида кальция и требуемой комбинации активаторов. Всего за время выполнения работы было получено 56 наборов экспериментальных данных. В них клетки активировались следующими комбинациями активаторов: 2, 20, 100 мкМ АД $\Phi$ ; 1, 3, 10 мкМ SFLLRN; 20 мкМ АД $\Phi$  +1, 3, 10 мкМ SFLLRN. Обработка полученных изображений проводилась программой ImageJ. Далее при помощи пакетов NumPy и Matplotlib для языка Python полученные временные зависимости нормировались на выгорание флуорофоров, принятое в первом приближении экспоненциальным.

Достоверность различий в количествах кальциевых пиков до и после активации определенным активатором оценивалась при помощи U-критерия Манна— Уитни с уровнем значимости p = 0.05 [14].

#### 1.5. Математическое моделирование

В качестве основы для построения модели возникновения осцилляций концентрации кальция в тромбоцитах была избрана редуцированная модель Кайзера— Де Янга [15], полученная путем уменьшения числа независимых переменных в более ранней работе этих же авторов [16]. В [15] ИФЗР может находиться в восьми состояниях в зависимости от того, какие лиганды связаны с ним. При редуцировании модели авторы оставили только два состояния: Х100 (рецептор связан с ИФЗ) и Х110 (рецептор связан с ИФЗ и ионом кальция на активирующем сайте) [16], в результате система из девяти дифференциальных уравнений была сведена к системе трех дифференциальных уравнений, приведенной ниже:

$$\frac{dX100}{dt} = -a_2[Ca^{2+}] \cdot X100 - -a_5[Ca^{2+}] \cdot X100 + b_5X110,$$
(1)

(

$$\frac{dX110}{dt} = -a_2[\operatorname{Ca}^{2+}] \cdot X110 + + a_5[\operatorname{Ca}^{2+}] + \frac{b_4}{4}[\operatorname{IP}_3] - b_5X110, \qquad (2)$$

$$\frac{d[\operatorname{Ca}^{2+}]}{dt} = \frac{1}{\tau} \left( \nu_0 - c_1 \nu_1 \left( [\operatorname{Ca}^{2+}] - \frac{c_0 - [\operatorname{Ca}^{2+}]}{c_1} \cdot X_1 10^3 - \frac{\nu_3 [\operatorname{Ca}^{2+}]^2}{[\operatorname{Ca}^{2+}]^2 + k_3^2} \right).$$
(3)

Здесь  $[Ca^{2+}]$ ,  $[IP_3]$  — концентрации соответственно кальция и ИФЗ в цитозоле. Параметры модели  $a_i$  и  $b_i$ описывают прямые и обратные константы реакций перехода между состояниями рецептора. Параметр  $\tau$  был принят равным единице, но авторы статьи [16] указывают на него как на основной инструмент адаптации модели к определенному типу клетки. Параметры уравнений приведены в таблице. Интегрирование и исследование модели проводилось при помощи библиотек SciPy, NumPy и PyDSTool для Python 2.7.

## БИОФИЗИКА И МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА

Параметр	Значение	Описание
$c_0$	2 мкМ	Общая концентрация ионов кальция в клетке
$c_1$	0.185	Соотношение объемов ЭПР и цитозоля
$\nu_0$	0.11 мкМ с <sup>-1</sup>	Постоянный поток утечки
$\nu_1$	$6 c^{-1}$	Максимальная пропускная способность рецептора
$\nu_3$	$0.45 \text{ мк} \text{M}^{-1} \text{ c}^{-1}$	Максимальная скорость работы помпы SERCA
$k_3$	0.1	Константа диссоциации для помпы SERCA
$a_2$	$0.2 \text{ мк} M^{-1} \text{ c}^{-1}$	Константа связывания для кальция (ингибирование)
$a_5$	$20 \text{ мк} \text{M}^{-1} \text{ c}^{-1}$	Константа связывания для кальция (активация)
$b_2$	$0.21 \ c^{-1}$	Константа связывания для ИФЗ
$b_5$	$1.64 c^{-1}$	Константа диссоциации для кальция

#### Таблица. Параметры математической модели



Рис. 3. Определение динамики концентрации кальция в тромбоците методом микроскопии полного внутреннего отражения: *a* — типичная микрофотография области образца при освещении лазером с длиной волны 405 нм. Белым квадратом показана область оценки флуоресценции; *б* — типичная зависимость средней интенсивности флуоресценции в выделенной области от времени для одной области

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ

#### 2.1. Профили концентрации кальция в цитозоле иммобилизованного на фибриногене тромбоцита в покое и при активации

Наблюдение динамики концентрации кальния в тромбоците проводилось методом микроскопии полного внутреннего отражения, когда флуоресценция возбуждается в тонком слое на границе образецпокровное стекло. Интенсивность излучения, испускаемого флуоресцентной краской Fura-2 при освещении 405 нм, предполагается пропорциональным концентрации свободных от кальция молекул краски. На микрофотографиях клетки выглядели как контрастные пятна на темном фоне. На рис. 3 показано типичное поле зрение при иммобилизации тромбоцитов на фибриногене. При возникновении очередного пика концентрации кальция в цитозоле одной из клеток интенсивность излучения Fura-2 уменьшалась в несколько раз (рис. 3).

Частоты кальциевых осцилляций оценивались как число пиков, отличных от шума, на приходящиеся 180 с наблюдения. Согласно полученным данным, средняя частота осцилляций интенсивности излучения, испущенного флуоресцентными метками на кальций, в покоящихся тромбоцитах составила  $f = 0.12 \pm 0.04$  Гц (n = 58). Относительные приращения частот осцилляций интенсивности излучения ( $\Delta f$ ), испущенного

флуоресцентными метками на кальций для случаев активации тромбоцитов отдельными агонистами, приведены на рис. 4.

Статистическое различие между частотами осцилляций интенсивности излучения, испущенного флуоресцентными метками на кальций, в неактивированных и активированных тромбоцитах было установлено при помощи одностороннего U-критерия Манна—Уитни с p = 0.05 во всех экспериментах.



Рис. 4. Относительные приращения частот осцилляций интенсивности излучения  $\Delta f$ , испущенного кальциевой меткой Fura 2-AM для случаев активации тромбоцитов различными комбинациями активаторов: A1 – 2 мкм АДФ, A2 – 20 мкМ АДФ, A3 – 100 мкМ АДФ, A4 – 3 мкМ SFLLRN, A5 – 10 мкМ SFLLRN, A6 – 20 мкМ АДФ + 1 мкМ SFLLRN, A7 – 20 мкМ АДФ + 3 мкМ SFLLRN. Черными вертикальными линиями показаны значения стандартных отклонений

Из приведенных здесь данных видно, что степень активации тромбоцита кодируется частотой осцилляций кальция, что характерно и для других невозбудимых клеток, и было нами теоретически предсказано в нашей предыдущей работе [9]. Кроме того, из данных следует, что совместная активация тромбоцитов SFLLRN и АДФ приводит к более интенсивному ответу, нежели при активации тромбоцитов исключительно одним активатором.

## 2.2. Математическая модель осцилляций кальция в цитозоле тромбоцита

Интересной особенностью полученных экспериментальных данных оказалась специфическая форма пика осцилляций концентрации кальция (рис. 5, а), наблюдаемая при всех использованных видах активации. Для пика интенсивности флуоресценции характерен быстрый рост в течение 0.5 с и медленная релаксация, занимающая на порядок больше времени, чем рост. Качественный анализ экспериментальных данных позволяет предположить, что форма пика концентрации кальция остается постоянной вне зависимости от частоты осцилляций. При этом при увеличении частоты осцилляций происходит «слияние» пиков без изменения характерной формы (рис.  $5, \delta$ ). Существующие математические модели кальциевых осцилляций для отдельных ИФЗР [17] не описывают подобное поведение. Для определения причины этого явления в настоящей работе мы модифицировали классическую модель возникновения осцилляций концентрации кальция в цитозоле Кайзера-Де Янга (см. Методы).

Согласно работе [15] желаемое поведение концентрации кальция в цитозоле может быть получено в модели (1)–(2) с квазистационарным приближением для концентрации кальция. Однако такая система предсказывает слишком быстрый спад пика концентрации кальция при наблюдаемых в эксперименте частотах (данные не показаны). Поэтому в дальнейшем для описания системы использовалась модель (1)–(3).

Несмотря на то, что частоты, предсказываемые моделью Кайзера-Де Янга, достаточно хорошо со-



Рис. 5. Типичная зависимость относительной концентрации кальция в тромбоците от времени: а — типичная форма одиночного пика; б — типичная последовательность пиков, показано слияние первых двух при увеличении частоты осцилляций

гласуются с наблюдаемыми нами в экспериментах, подобная динамика концентрации кальция не наблюдается при интегрировании данной модели. Напротив, темпы роста пика концентрации кальция в этой модели значительно уступают темпам релаксации (рис. 6, *a*). Для адаптации модели к экспериментальным данным было проведено варьирование параметров, которое, однако, не дало ожидаемого результата.

Поэтому для учета кластеризации ИФЗР, приводящей к кооперативному поведению этих ионных каналов [18], в модель был введен коэффициент кооперативности *B*, который описывает кооперативность ответа системы рецептор—кальций как целого. При этом



Рис. 6. Исследование математической модели формирования осцилляций концентрации кальция в тромбоците: a — симуляция зависимости концентрации кальция от времени для исходной модели (1)–(3);  $\delta$  — бифуркационная диаграмма для новой модели (1), (2), (4). НВ — точки бифуркаций Хопфа, Р — точки начала и конца исследования; e — зависимость модуля мнимой части собственного значения Якобиана системы с наибольшей действительной частью от концентрации ИФЗ; e — симуляция зависимости концентрации кальция от времени для новой модели (1), (2), (4);  $\partial$  — симуляция зависимости концентрации кальция от времени для новой модели (1), (2), (4) при переменых значениях ИФЗ (пунктирная линия)

уравнение (3) принимает вид

$$\frac{d[\operatorname{Ca}^{2+}]}{dt} = \frac{1}{\tau} \left( (\nu_0 - c_1 \nu_1 \left( [\operatorname{Ca}^{2+}] - \frac{c_0 - [\operatorname{Ca}^{2+}]}{c_1} X_{110}^A \right)^B - \frac{\nu_3 [\operatorname{Ca}^{2+}]^2}{[\operatorname{Ca}^{2+}]^2 + k_3^2} \right).$$
(4)

Для новой системы (1), (2), (4) концентрация ИФЗ по-прежнему является бифуркационным параметром и при концентрациях ИФЗ, равных 0.1 и 0.7 мкМ, наблюдается рождение предельного цикла (рис. 6,  $\delta$ ). Интересно, что значение мнимой части параметра Ляпунова для соответствующего стационарного состояния в точках бифуркации увеличивается при увеличении концентрации ИФЗ (рис. 6,  $\epsilon$ ), что по теореме Хопфа [19] может означать возрастание частоты осцилляций концентрации кальция с концентрацией ИФЗ и, следовательно, силы активации тромбоцита.

В новой модели оказалось возможным подобрать значения параметров таким образом, чтобы осцилляции кальция были схожи по форме и частоте с экспериментальными данными (рис. 6, г). Соответствующие значения параметров A и B равны 4.6 и 1.7.

Совмещенные данные, полученные в эксперименте и в результате интегрирования модели, приведены на рис. 7. Из рис. 6 и 7 видно, что модель (1), (2), (4) позволяет описать наблюдаемые в эксперименте частоты осцилляций, скорость увеличения концентрации кальция в цитозоле и среднюю скорость спада концентрации кальция в цитозоле.



Рис. 7. Сравнение профиля кальциевого пика, полученного в эксперименте (непрерывная линия) и предсказанного моделью (пунктирная линия). Экспериментальные данные нормированы на величины, предсказываемые моделью. Модель описывает темп спада концентрации кальция в пике, однако профили пиков несколько отличаются друг от друга

При интегрировании модели с переменными значениями концентрации ИФЗ, характерными для активации тромбоцита через ассоциированный с G-белком рецептор, происходит характерное для экспериментальных данных «слияние» пиков осцилляций кальция (рис. 6,  $\partial$ ).

## 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе проводится экспериментальнотеоретическое исследование механизма развития осцилляций концентрации кальция в цитозоле тромбоцита при его активации агонистами ассоциированных с Gq-белками рецепторов. В работе проведен сбор экспериментальных данных для активации одиночных иммобилизованных на фибриногеновой подложке тромбоцитов АДФ и SFLLRN. Осцилляции кальция в цитозоле описываются с помощью модифицированной модели Кайзера—Де Янга. В результате исследования показано, что характерная для эксперимента форма пика осцилляций кальция может быть описана только в предположении кластеризации ИФЗР.

Использование микроскопии полного внутреннего отражения вместо обычно используемой для тромбоцитов конфокальной или эпифлуоресцентной микроскопии [7, 20, 21] обосновано двумя принципами: принципом максимизации соотношения сигнал-шум и принципом минимизации выгорания флуорофора. Это достигалось подбором параметров микроскопии полного внутреннего отражения (выбор угла, близкого к критическому, фокусировка луча и осуществление равномерного освещения области) и подбором такой мощности возбуждающего излучения, при которой степень выгорания флуорофоров на типичном времени съемки (10 мин) позволяла бы отличать пики интенсивности излучения, вызванные ростом концентрации кальция, от шума. Использование Fura-2 в качестве флуорофора основано на том, что у Fura-2 высокий квантовый выход и только с Fura-2 стало возможным разрешение отдельных пиков интенсивности испущенного излучения. Освещение не более 10% объема клетки в ходе эксперимента позволяет на порядок уменьшить выгорание краски в данной клетке за счет быстрой диффузии невыгоревшей краски в область съемки (рис. 3, б).

В наших предыдущих теоретических работах [4, 9, 10], посвященных кальциевой сигнализации при активации тромбоцита, нами было сделано теоретическое предположение, что в тромбоците сила активации может кодироваться частотой осцилляций концентрации кальция. В настоящей работе впервые получено экспериментальное подтверждение этого феномена: при увеличении концентрации АДФ с 2 до 100 мкМ средняя частота осцилляций возрастает с 0.22 до 0.35 Гц. Этот феномен получил дополнительное теоретического обоснование при качественном анализе математической модели: модуль мнимой части главного показателя Ляпунова для предельного цикла оказался монотонно зависящим от концентрации ИФЗ, т.е. от силы активатора (рис. 6). Хотя в аналогичных моделях кальциевых осцилляций для других клеток [22] также наблюдался подобный эффект, для тромбоцита частотная кодировка активации выявлена впервые.

Основным результатом настоящего исследования является наблюдение и математическое описание формы пика осцилляции кальция в тромбоците (рис. 5). Несмотря на то, что осцилляции концентрации кальция наблюдались во многих исследованиях, в большинстве из них частота съемки оказывалась недостаточна для наблюдения формы пика [6, 7, 20, 21]. Характерная особенность пика концентрации кальция в тромбоците является резкий подъем концентрации и медленный спад. Такая форма сигнала свидетельствует о быстром входе кальция в цитозоль и относительно медленной откачке. Однако уменьшение активности помпы SERCA приводит к исчезновению колебаний, а не к изменению формы пика (данные не показаны). Следовательно, выход кальция в цитозоль происходит быстрее, чем позволяет открытый канал в мембране

и градиент концентраций. Как показало настоящее исследование, быстрота этого процесса обеспечивается наличием кооперативности (коэффициенты в степени в уравнении (4) больше 1) в открытии каналоврецепторов ИФЗР при повышении концентрации ИФЗ и кальция в цитозоле [23]. Логично предположить, что такая кооперативность обеспечивается взаимодействием субъединиц рецептора и рецепторами друг с другом, т. е. кластеризацией рецепторов [24].

Предлагаемая в настоящей работе математическая модель осцилляции концентрации кальция в цитозоле тромбоцита является развитием общей модели Кайзера-Де Янга [15] и не является специфичной для тромбоцита. Модель используется для описания механизмов развития кальциевых осцилляций, таким образом, перед нами не стояла задача полностью описать кальциевую сигнализацию и закономерности ее развития. Для включения настоящей модели в компьютерные модели активации тромбоцита может потребоваться ее значительная переработка. С учетом предполагаемой кластеризации ИФЗР более корректным было бы рассмотрение тромбоцита как распределенной системы.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате настоящего исследования показано, что при активации тромбоцита через рецепторы к АДФ или тромбину развиваются осцилляции с частотой, монотонно зависящей от концентрации активатора. Эти осцилляции обладают несимметричной формой пика, которая может быть описана теоретически только в предположении кооперативного взаимодействия рецепторов к инозитолтрифосфату.

Авторы выражают благодарность член.-корр. РАН Атауллаханову Фазоилу Иноятовичу (ЦТП ФХФ РАН) за поддержку и обсуждение полученных данных, а также Мустяце Вадиму Вадимовичу (ННПЦ ДГОИ им. Дм. Рогачева) за техническую поддержку.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 17-74-20045.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Michelson A. D. Platelets. Elsevier 2013.
- Purvis J. E., Chatterjee M. S., Brass L. F. et al. // Blood. 2008. 112. P. 4069.
- 3. Lian L., Wang Y., Draznin J. et al. // Blood. 2005. 106. P. 110.
- Sveshnikova A. N., Ataullakhanov F. I., Panteleev M. A. // Mol. Biosyst. 2015. 11. P. 1052.
- Varga-Szabo D., Braun A., Nieswandt B. // J. Thromb. Haemost. 2009. 7. P. 1057.
- Obydennyy S. I., Sveshnikova A. N., Ataullakhanov F. I. et al. // J. Thromb. Haemost. 2016. 14. P. 1867.
- Heemskerk J. W., Hoyland J., Mason W. T. et al. // Biochem. J. 1992. 283, N 2. P. 379.
- Chalmers M., Schell M. J., Thorn P. // Biochem. J. 2006. 394. P. 57.
- Balabin F.A., Sveshnikova A. N. // Math. Biosci. 2016. 276. P. 67.
- Shakhidzhanov S. S., Shaturny V. I., Panteleev M. A. et al. // Biochim. Biophys. Acta" Gen Subj. 2015.
- Sveshnikova A. N., Balatskiy A. V., Demianova A. S. et al. // J. Thromb. Haemost. 2016. 14. P. 2045.
- Mazel T., Raymond R., Raymond-Stintz M. et al. // Biophys. J. 2009. 96. P. 1691.
- Jobe S. M., Wilson K. M., Leo L. et al. // Blood. 2008. 111. P. 1257.
- 14. Варден Б. Л. Математическая статистика. М.: ИЛ, 1960.
- De Young G. W., Keizer J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. 89, P. 9895.
- 16. Keizer J., De Young G. // J. Theor. Biol. 1994. 166. P. 431.
- Sneyd J., Falcke M. // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2005. 89. P. 207.
- 18. Skupin A., Falcke M. // Genome Inform. 2008. 20. P. 15.
- Mees A., Chua L. // IEEE Trans. Circuits Syst. 1979. 26. P. 235.
- Heemskerk J. W., Vuist W. M., Feijge M. A. et al. // Blood. 1997. 90. P. 2615.
- Hussain J. F., Mahaut-Smith M. P. // J. Physiol. 1999. 514, N 3. P. 713.
- 22. Keener J. P., Sneyd J. Mathematical Physiology. Book. 2008.
- 23. *Keener J., Sneyd J.* Calcium Dynamics. In: Mathematical Physiology. 2009. P. 273.
- 24. Rahman T. // Biochem. Soc. Trans. 2012. 40. P. 325.

## Clusterization of Inositol Trisphosphate Receptors Determines the Shape of the Calcium Oscillation Peak in Platelet Cytosol

F. A. Balabin<sup>1a</sup>, D. S. Morozova<sup>2</sup>, A. S. Mayorov<sup>1,3,4</sup>, A. A. Martyanov<sup>1,3,4</sup>, M. A. Panteleev<sup>1,3,4</sup>, A. N. Sveshnikova<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, RAS. Moscow 119991, Russia

<sup>2</sup>Faculty of Basic Medicine, Lomonosov Moscow State University. Moscow 119991, Russia

<sup>3</sup>Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University. Moscow 119991, Russia

<sup>4</sup>National Medical Investigation Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology

named after Dmitry Rogachev. Moscow 117198, Russia

E-mail: <sup>a</sup>fa.balabin@physics.msu.ru.

Platelets, which are anucleate blood cells, should have the capacity to respond to an external stimulus within 1 second. This capacity is maintained by calcium signaling, the process of intracellular signal transmission mediated by an increase of the calcium ion concentration in the cytosol due to calcium release from the endoplasmic reticulum through the inositol trisphosphate receptor channel (IP3R). The increase of the calcium concentration in the platelet cytosol is not monotonous, but rather has an oscillatory character, similar to the processes in many other cell types. The regularities that underlie the development of these oscillations were subjected to theoretical and experimental analysis in the present study. Total internal reflection microscopy of platelets immobilized on fibrinogen and loaded with the Fura-2 calcium-sensitive fluorescent label was used to monitor the dynamics of calcium concentration. The mathematical model of the IP3R–ATPase pair from [15] modified to take the platelet parameters into account was used to describe the process of oscillation development. The results of the study demonstrated a characteristic peak shape for calcium oscillations in the platelet: theoretical description of the peak shape essentially required the introduction of corrections that had the physical meaning of cooperative IP3R activation.

*Keywords:* blood platelets, intracellular signaling, thrombin, inositol trisphosphate, calcium signaling, mathematical modeling, fluorescence microscopy. PACS: 87.10.Ed, 87.16.Xa, 87.64.kv. *Received 11 November 2017.* 

English version: Moscow University Physics Bulletin. 2018. 73, No. 5. Pp. 526-533.

## Сведения об авторах

- 1. Балабин Федор Алексеевич мл. науч. сотрудник; e-mail: fa.balabin@physics.msu.ru.
- 2. Морозова Дарья Сергеевна студент; e-mail: darsmorozova@gmail.com.
- 3. Майоров Александр Сергеевич студент; e-mail: as.maiorov@physics.msu.ru.
- 4. Мартьянов Алексей Александрович студент; e-mail: aa.martyanov@physics.msu.ru.
- 5. Пантелеев Михаил Александрович доктор физ.-мат. наук, профессор; e-mail: mapanteleev@yandex.ru.
- 6. Свешникова Анастасия Никитична канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник; e-mail: agolomy@gmail.com.