

ФИЗИКА НАШИХ ДНЕЙ

Кальциевые осцилляции в тромбоцитах крови и их возможная роль в "интерпретации" клеткой информации из внешнего мира

С.С. Шахиджанов, Ф.А. Балабин, С.И. Обыденный,
Ф.И. Атауллаханов, А.Н. Свешникова

Ионы Ca^{2+} в клетке играют важную роль в передаче и трактовке информации, получаемой клеткой из внешней среды. При поступлении внешних сигналов клетка может за доли секунды в несколько сотен раз увеличить концентрацию Ca^{2+} внутри себя, что служит сигналом для включения разных систем клетки, формирующих её ответ на внешний стимул. Во многих клетках при появлении внешнего стимула концентрация Ca^{2+} не только возрастает, но и начинает осциллировать. Сила внешнего сигнала влияет как на частоту, так и на амплитуду этих осцилляций. Есть основания предполагать, что преобразование внешнего сигнала в осциллирующий сигнал внутри клетки имеет важный информационный смысл. Рассмотрены методы измерения динамики концентрации Ca^{2+} в клетке и механизмы формирования этих колебаний, изложены гипотезы о том, как клетка декодирует осцилляции концентрации Ca^{2+} . Основным объектом рассмотрения является тромбоцит — клетка, играющая ключевую роль в остановке кровотечения. При повреждении сосудов тромбоцит резко активизируется. В процессе остановки кровотечения изначально одинаковые тромбоциты разделяются на три популяции, решающие совершенно разные задачи. По-видимому, тромбоцит как-то "интерпретирует" совокупность внешних сигналов и с помощью осцилляций концентрации Ca^{2+} "решает", какой из популяций он будет принадлежать. Относительная простота тромбоцита позволяет надеяться, что исследования этой клетки скоро приведут к расшифровке "кода", скрывающегося за колебаниями концентрации Ca^{2+} .

Ключевые слова: осцилляции концентрации внутриклеточного кальция, тромбоциты, кодировка, декодировка, бифуркация Пуанкаре – Андронова – Хопфа

PACS numbers: 87.10.Ed, **87.16. – b**, **87.19. – j**

DOI: <https://doi.org/10.3367/UFNr.2018.05.038335>

Содержание

1. Введение (703).
2. Выполнение тромбоцитами своих задач в сложных условиях (704).
3. Феномен импульсной генерации кальциевого сигнала в тромбоцитах (705).
 - 3.1. Колебания концентрации Ca^{2+} .
 - 3.2. Как клетка "интерпретирует" сигналы из окружающей среды.
 - 3.3. Эволюция кальциевой сигнализации.

С.С. Шахиджанов^{(1,2,*), Ф.А. Балабин^{(1,†), С.И. Обыденный^{(1,3), Ф.И. Атауллаханов^{(1,2,3,‡), А.Н. Свешникова^(1,2,3,4)}}}}

⁽¹⁾ Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, ул. Косыгина 4, 119991 Москва, Российская Федерация

⁽²⁾ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет,

Ленинские горы 1, стр. 2, 119991 Москва, Российская Федерация

⁽³⁾ Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачёва, ул. Саморы Машела 1, 117997 Москва, Российская Федерация

⁽⁴⁾ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет),

ул. Трубецкая 8, стр. 2, 119991 Москва, Российская Федерация

E-mail: * shakhidzhanov.s@yandex.ru, † fa.balabin@physics.msu.ru,

‡ ataullakhanov.fazly@gmail.com

Статья поступила 8 мая 2018 г.

4. Математическое моделирование осцилляций концентрации кальция (707).

4.1. Сеть биохимических реакций, определяющих динамику концентрации Ca^{2+} в тромбоците. 4.2. Простая математическая модель динамики концентрации Ca^{2+} в клетке. 4.3. Пороговое поведение системы. 4.4. Как клетка управляет частотой колебаний концентрации Ca^{2+} . 4.5. Стохастическая составляющая осцилляций концентрации Ca^{2+} . 4.6. Детальное моделирование динамики Ca^{2+} в клетке.

5. Расшифровка кальциевого сигнала в клетке (713).

6. Заключение (715).

Приложение 1. Как наблюдают за концентрацией кальция в тромбоците (716).

Приложение 2. Бифуркация Пуанкаре – Андронова – Хопфа (717).

Приложение 3. Усложнённая модель кальциевых осцилляций (717).

Список литературы (718).

1. Введение

Любая живая система должна непрерывно обмениваться энергией, веществом и информацией с окружающей средой — все биологические системы являются открытыми. Так, любые клетки должны иметь возможность не только обеспечивать себя жизненно важной энергией, но и адекватно реагировать на внешние стимулы окружаю-

щей среды. Для этого они развили в себе множество сложных механизмов, которые позволяют им адекватно "воспринимать" окружающую их среду и реагировать на её изменения. Клетка анализирует состояние окружающей среды с помощью разнообразных рецепторов, расположенных на её поверхности, на клеточной мембране. Каждый рецептор избирательно реагирует на какое-то определённое вещество или воздействие. Получив сигнал, рецептор передаёт его внутрь клетки, вызывая изменение концентраций специальных веществ, которые являются внутриклеточными сигналами — "вторичными мессенджерами" [1]. Одним из таких важнейших механизмов передачи информации от внешних раздражителей внутрь клетки является система, управляющая концентрацией внутриклеточного кальция (Ca^{2+}) [2], который в свою очередь влияет на значительное количество процессов, происходящих в клетке [3, 4]. Механизм передачи внешних сигналов через концентрацию внутриклеточного Ca^{2+} оказался настолько удобным и универсальным, что множество клеток стало использовать его для получения самой разной информации из внешней среды. В качестве примеров клеток, в которых концентрация кальция играет важную сигнальную роль, можно привести клетки мышц [5], нейроны [6], астроциты [7], ооциты [7, 8] и множество клеток крови [9, 10]. Во всех этих клетках изменение концентрации Ca^{2+} приводит к различным ответам: в клетках мышц вызывает их сокращение, в нейронах является командой к проведению сигнала, в клетках крови приводит к их активации.

Идея о том, что кальций может играть роль вторичного мессенджера, берёт начало в 1883 г., когда Сидней Рингер исследовал сокращение крысиных сердец [11]. Рингер сначала помещал сердца в жёсткую водопроводную воду: в ней сердца прекрасно сокращались. Затем он заменил водопроводную воду дистиллированной и обнаружил, что сокращение сердец значительно ослабло и в конце концов вообще прекратилось. Однако после добавления солей кальция в дистиллированную воду сердца в ней снова стали нормально сокращаться. Впоследствии множество исследователей проводили эксперименты по сокращению различных мышечных тканей и обнаружили, что кальций не только необходим для сокращения мышечных тканей, но и он сам может непосредственно вызывать их сокращение. Первые исследования концентрации кальция в клетке проводили с помощью люминесцентного кальций-связывающего белка экворина [12], который вводили в клетку с помощью микроинъекций. Большой прорыв в таких исследованиях произошёл сначала в 1977 г. [13], когда обнаружили, что во время оплодотворения ооцита концентрация кальция в нём повышается в несколько раз. В 1980 г. Тьен с коллегами синтезировали целый ряд флуоресцентных красителей, позволяющих наблюдать за изменением концентрации кальция в одиночной клетке (см. приложение 1) [14]. Позднее, в 1986 г., Вудс с коллегами [15] обнаружили, что при активации клеток печени внешними сигналами — гормонами — в клетках не просто возрастает концентрация Ca^{2+} — клетка реагирует генерацией пакета очень коротких импульсов концентрации кальция высокой амплитуды (рис. 1). Частота этих колебаний зависит от силы сигнала. Вскоре кальциевые колебания были открыты и в других клетках. Стало ясно, что клетка может отвечать на внешнее воздействие осциллирующим каль-

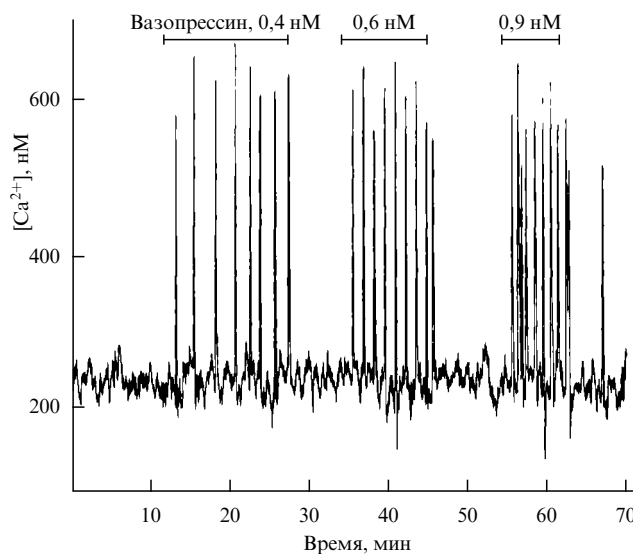


Рис. 1. Пример осцилляций концентрации Ca^{2+} в клетках печени гепатоцитах при различных концентрациях их активатора — гормона вазопрессина. Концентрация кальция в клетках измерялась с помощью экворина [12]. Хорошо видны периодичность и зависимость частоты колебаний концентрации Ca^{2+} от концентрации активатора. (Из работы [15].)

циевым сигналом разной частоты и амплитуды [16]. Дальнейшие исследования кальциевой сигнализации показали, что такие осцилляции являются универсальным механизмом передачи информации во многих клетках — это привело к появлению нового направления исследований в клеточной биологии.

Одной из клеток крови, в которых внешний сигнал вызывает колебания концентрации кальция, является тромбоцит. На эту клетку возложена важная задача остановки кровотечения в случае повреждения кровеносных сосудов [17]. Повреждение стенки кровеносного сосуда приводит к контакту крови с рядом веществ, побуждающих тромбоцит активироваться. Тромбоцит — это относительно просто устроенная клетка крови, не имеющая ядра и многих других систем полноценной клетки. Тем не менее реакции тромбоцита на внешние стимулы довольно разнообразны [18], что приводит нас к следующему заключению: тромбоцит не просто единообразно реагирует на внешние воздействия, но и каким-то образом "интерпретирует" их спектр и силу. В данном случае повреждение кровеносного сосуда как раз и является тем самым внешним стимулом, побуждающим тромбоцит активироваться и, как следствие, выполнить свою задачу. В настоящей статье мы рассмотрим различные вопросы, связанные с наблюдениями и интерпретацией осцилляций концентрации кальция в тромбоцитах крови.

2. Выполнение тромбоцитами своих задач в сложных условиях

Тромбоциты и тромб. Тромбоциты останавливают кровотечение, формируя в месте повреждения сосуда тромбоцитарный агрегат, состоящий из множества тромбоцитов. В процессе роста этого агрегата важно не допустить перекрытия сосуда (окклюзии), поскольку это прервёт снабжение тканей вокруг сосуда жизненно важ-

ным кислородом. Дополнительную сложность добавляет и то, что необходимо безошибочно решать эту задачу для повреждений разных размеров в разных сосудах с различными скоростями течения крови. Пока механизм роста и остановки роста тромбоцитарного агрегата во многом остаётся непонятным. Лишь недавние исследования немного приоткрыли завесу. Мы опишем упрощённую картину.

В работах [19–23] показано, что тромб обладает сложной структурой — у него есть внутреннее ядро и внешняя оболочка. Во внутреннем ядре находятся "сильно активированные" тромбоциты. По-видимому, их основной задачей является предотвращение потери крови — они распластываются на месте повреждения и создают тесные контакты с соседями. Некоторые из тромбоцитов в ядре, непосредственно контактирующих с местом повреждения, переходят в сверхактивированное состояние "прокоагулянтной" активности [24]. Прокоагулянтные тромбоциты выполняют совершенно другую функцию — они не создают контактов с соседними тромбоцитами, но интенсивно производят факторы, вызывающие сильную активацию соседних тромбоцитов (например, к таким факторам относится тромбин). Ядро тромбоцитарного агрегата защищено от потока крови оболочкой из "слабо активированных" тромбоцитов, которые не создают плотных контактов между собой и могут отсоединяться от тромбоцитарного агрегата. Вероятно, этот процесс вносит свой вклад в ограничение роста тромба [25].

Итак, часть тромбоцитов производит факторы, активирующие другие тромбоциты, другая часть предотвращает потерю крови, а третья — защищает остальные тромбоциты от потока и ограничивает рост тромба. Это означает, что исходно одинаковые тромбоциты в тромбе становятся разными. Тромбоцит, попадающий в тромб или на место повреждения, должен быстро принять правильное решение, к какому типу тромбоцитов он должен относиться, основываясь только на данных о своём окружении.

Своё окружение тромбоцит может "изучать" с помощью различных рецепторов, имеющих на его поверхности [26]. К ним относятся рецепторы к таким молекулам, как аденозиндифосфат (АДФ), коллаген и тромбин. Молекулы коллагена, изначально спрятанные за стенкой сосуда, становятся доступными кровотоку только при повреждении сосуда. Тромбоциты, связываясь с коллагеном, могут "понимать", что они находятся непосредственно в месте повреждения сосуда. Было показано, что тромбоциты, связавшие коллаген, могут сильно активироваться, прочно склеиваясь в ядро тромба. Но часть из них переходит в прокоагулянтное состояние. Прокоагулянтные тромбоциты способствуют производству тромбина, который может приводить к сильной активации следующих слоёв тромбоцитов. В свою очередь сильно активированные тромбоциты вместе с прокоагулянтными выбрасывают АДФ, который может вызывать слабую активацию тромбоцитов в защитном слое (оболочке) тромбоцитарного агрегата.

С другой стороны, нельзя допускать случайной активации тромбоцитов. Так, например, в процессе формирования тромба происходят диффузия и/или конвекция тромбина и АДФ, благодаря которым эти молекулы могут переноситься на большие расстояния от тромба. Поэтому в тромбоцитах должны существовать меха-

низмы, которые позволят отличать эти слабые "ложные" сигналы от истинных, т.е. тромбоцит должен иметь возможность анализировать силу внешних сигналов.

3. Феномен импульсной генерации кальциевого сигнала в тромбоцитах

3.1. Колебания концентрации Ca^{2+}

На рисунке 2 приведены кадры видеосъёмки тромбоцитов после активации тромбином. Ca^{2+} визуализирован с помощью флуоресцентной микроскопии клеток, в которые введён прижизненный краситель Fluo 3-AM, способный связывать Ca^{2+} , при этом резко возрастает его флуоресценция (см. детали в приложении 1). Интенсивность свечения тромбоцитов в каждом кадре можно сопоставить с величиной концентрации Ca^{2+} и тем самым наблюдать динамику Ca^{2+} в одиночной клетке. На рисунке 3а показана динамика $[\text{Ca}^{2+}]$, вызванная воздействием слабого активатора АДФ достаточной большой концентрации (10 мкМ). Тромбоциты отвечают генерацией серии импульсов большой амплитуды и высокой частоты. В сигнале заметно выражена стохастическая составляющая. На рисунке 3б показано, как изменяется ответ тромбоцита, когда к АДФ добавлен низкомолекулярный пептидный имитатор (SFLLRN) той части тромбинового рецептора, которая высвобождается тромбином и взаимодействует с самим рецептором, вызывая сильный отклик клеток. Хорошо видно, что активатор значительно увеличил частоту импульсов. Воздействие самого сильного активатора, тромбина, в большой концентрации (рис. 3в) вызывает слияние импульсов, приводя тем самым к практически постоянно высокому уровню концентрации Ca^{2+} в клетке. Таким образом, разные внешние стимулы кодируют в тромбоците осцилляции разной частоты.

3.2. Как клетка "интерпретирует" сигналы из окружающей среды

Число рецепторов разных типов на любой клетке, в том числе на тромбоците, обычно больше десяти [17]. Число внутриклеточных процессов, которые могут и должны изменяться в ответ на внешние сигналы, тоже велико. Удивительно, что, хотя такие внешние сигналы, как АДФ, коллаген и тромбин, связываются с разными рецепторами на поверхности тромбоцита, на последующих этапах внутриклеточной передачи информации все

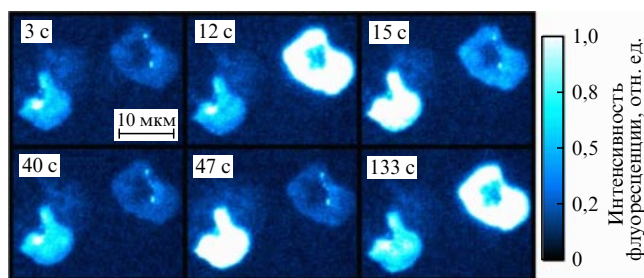


Рис. 2. Тромбоциты, загруженные флуоресцентным зондом Fluo 3-AM. Изображения получены с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti-E с объективом 100×-1.49NA в режиме полного внутреннего отражения.

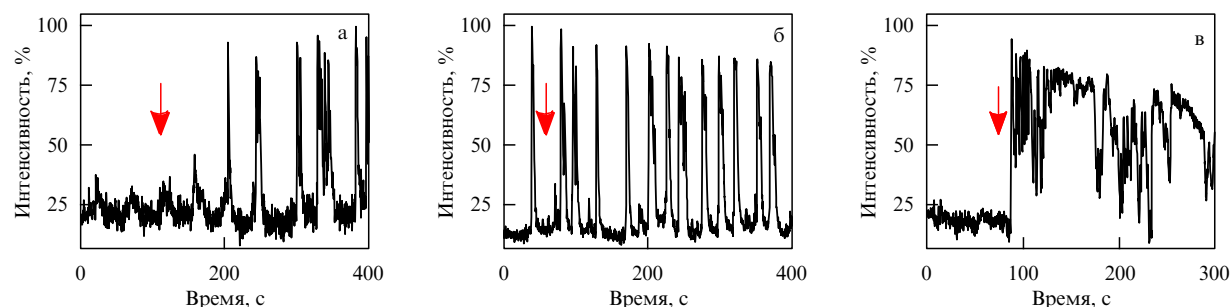


Рис. 3. Кальциевые осцилляции в тромбоците при разных активаторах. Активация тромбоцита (а) с помощью 10 мкМ АДФ; (б) с помощью 20 мкМ АДФ и 3 мкМ SFFLRN; (в) с помощью 100 нМ тромбина. Стрелками отмечены моменты активации тромбоцита.

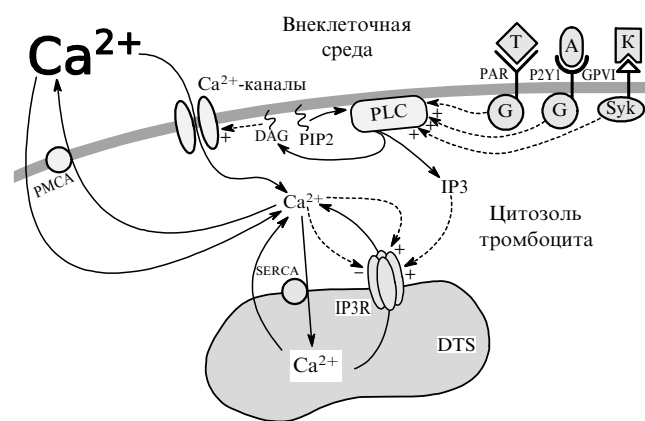


Рис. 4. Кальциевая сигнализация в тромбоците. Сплошными стрелками показано перемещение кальция между компартментами тромбоцита и внешней средой. Штриховыми стрелками показано активирующее (+) или ингибирующее (–) действие молекулы. Активатор тромбин (Т) связывается с рецепторами тромбоцита типа PAR (PAR1 и PAR4), что приводит к их активации и передаче сигнала фосфолипазе C (PLC) через специальные G-белки. Связывание G-белка с PLC приводит к тому, что PLC начинает расщеплять фосфолипид фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (PIP2) на две сигнальные молекулы: диацилглицерин (DAG) и инозитолтрифосфат (IP3). Молекулы PIP2 и DAG из-за наличия гидрофобных участков остаются в плазматической мембране клетки. Связывание активатора АДФ (А) с рецептором P2Y1 также вызывает активацию PLC через G-белки. Связывание коллагена (К) с рецептором GPVI приводит к активации другой изоформы PLC с помощью белка Syk. IP3, связываясь с рецепторами-каналами IP3R, расположенными на мембранах одного из внутриклеточных компартментов тромбоцита — плотной тубулярной системы (DTS), вызывает открытие этих каналов, что позволяет ионам кальция быстро выйти из DTS в цитозоль по градиенту концентрации. До тех пор пока концентрация выходящего из DTS кальция не превысит некоторого критического значения, IP3R будут удерживаться в открытом состоянии; при превышении концентрацией кальция этого критического значения начинается закрытие IP3R. Также кальций может и в отсутствие активатора медленно протекать из DTS непосредственно через его липидную мембрану. Эта протечка компенсируется активностью кальциевой помпы SERCA, которая закачивает кальций обратно в DTS. Таким же способом тромбоцит компенсирует протечки кальция через свою внешнюю плазматическую мембрану из внеклеточной среды — помпа PMCA переносит кальций во внеклеточную среду. Молекула DAG может связываться с различными кальциевыми каналами на внешней мембране тромбоцита и открывать их.

пути этих абсолютно разных сигналов сходятся в единый блок управления концентрацией внутриклеточного кальция (рис. 4). Но ответы клетки оказываются разными для разных комбинаций входных сигналов. Это означает, что

динамика концентрации кальция кодирует сигнал так, чтобы тромбоцит мог по-разному реагировать на разные внешние стимулы.

Природа могла бы пойти и другим путём, а именно могла бы создать для рецепторов каждого типа свой отдельный, не пересекающийся с другими, канал для передачи и формирования корректного ответа клетки на каждый из внешних сигналов. Однако, по-видимому, этот путь тупиковый, поскольку разные реакции клетки включают в себя множество молекулярных и биохимических процессов, так что разные физиологические реакции часто используют одни и те же биохимические системы. Чтобы сформировать физиологический ответ клетки, приходится привлекать множество молекулярных процессов в разных комбинациях. В этой ситуации использовать для каждого физиологического ответа клетки свой входной сигнал оказывается крайне неудобным. В то же время наличие некоего универсального внутриклеточного перекодирования сигналов представляется наиболее осмысленным методом управления. Не все сигналы и не во всех клетках передаются внутри клетки через динамику концентрации кальция. Есть и другие пути [27]. Но наличие перекодировки входных сигналов сейчас сомнений не вызывает, хотя мы и не очень понимаем логику и "язык" этого управления.

Судя по тому, что сегодня известно, тромбоциты, используя в основном этот механизм кодирования динамики внутриклеточной концентрации кальция, могут быстро и безошибочно самоорганизовываться в сложно устроенный тромбоцитарный агрегат.

3.3. Эволюция кальциевой сигнализации

Любопытно взглянуть на сегодняшние представления о возникновении кальциевого пути передачи сигналов в клетках в ходе эволюции [28]. По-видимому, в первичном океане, в котором возникли первые клетки, концентрация кальция была низкой — менее 5×10^{-8} М (так же как и внутри всех современных клеток). Однако со временем из-за снижения концентрации CO_2 в атмосфере и закисления океана концентрация кальция начала постепенно повышаться. Вероятно, повышение концентрации кальция оказалось неприятным сюрпризом в силу простой химии: кальций хорошо связывается с фосфатами, образуя нерастворимые соединения, а фосфаты к тому времени уже были крайне важны. Они входят в энергетическую "валюту" клетки — в молекулу аденозинтрифосфата (АТФ). Кроме того, сахарофосфатный остов — это основа ДНК и РНК, без которых невозможно представить жизнь на Земле. Поэтому первые

клетки начали вырабатывать защитные механизмы — специальные насосы, которые откачивали кальций из клеток во внешнюю среду (потребляя АТФ) и тем самым помогали поддерживать низкую концентрацию кальция внутри клетки. Более того, вероятно, со временем в этих клетках с кальциевыми насосами повышение концентрации кальция во внутриклеточной среде могло стать маркером того, что в их мембране произошёл "прорыв" и надо срочно принимать меры для "закрытия" дыры, — появилась первая сигнализация. До сих пор этот механизм сообщения о повреждениях мембраны действует в самых простых клетках нашего организма — эритроцитах [29], в которых практически полностью отсутствуют другие пути кальциевой сигнализации. Удивительно, что по мере повышения концентрации кальция в мировом океане происходило усложнение жизни — начали появляться ядерные клетки и первые многоклеточные организмы. Вероятно, на этом этапе клеткам удалось приспособиться к изначально опасному для них кальцию, превратив изменение его концентрации в очень удобный и хорошо контролируемый инструмент передачи информации, что позволило значительно увеличить сложность клеток и организмов. В настоящее время концентрация кальция в мировом океане практически точно совпадает с его концентрацией в крови — 2×10^{-3} М.

4. Математическое моделирование осцилляций концентрации кальция

На сегодняшний день молекулярные механизмы осцилляций концентрации кальция в клетке в ответ на появление внешнего стимула достаточно хорошо понятны для многих клеток. Это понимание положено в основу ряда математических моделей [30]. Модели осцилляций предложены для самых разных клеток, например для клеток мышц [31], нейронов [32], астроцитов [33], гепатоцитов [34], лейкоцитов [35], ооцитов [36] и тромбоцитов [37]. Несмотря на то что эти клетки решают самые разные физиологические задачи, оказалось, что принципы, лежащие в основе осцилляций концентрации кальция в этих клетках, одинаковы. Упрощённая схема основных молекулярных механизмов кальциевой регуляции, которая приводит к осцилляциям внутриклеточной концентрации кальция, показана на рис. 4.

4.1. Сеть биохимических реакций, определяющих динамику концентрации Ca^{2+} в тромбоците

Для того чтобы кальциевая сигнализация была эффективной, в неактивном состоянии внутри клетки (в её цитоплазме) поддерживается очень низкая концентрация ионов кальция, менее 5×10^{-8} М, в то время как во внеклеточной жидкости концентрация кальция равна 2×10^{-3} М [38]. Такой большой градиент концентрации кальция поддерживается с помощью специальной белковой молекулы — кальциевого насоса, постоянно "откачивающего" кальций из клетки в направлении против градиента концентрации (кальциевая АТФаза плазматической мембраны — Plasma Membrane Calcium ATPase, PMCA). PMCA-насос потребляет значительную долю энергии (молекул АТФ), производимой в этой клетке.

Также важным элементом, необходимым для кальциевой сигнализации, является плотная тубулярная система (Dense Tubular System — DTS) [39]. Это один из

внутриклеточных компартментов (производное эндоплазматического ретикулума), который отделён от цитоплазмы клетки собственной липидной мембраной. Наличие разных компартментов в клетке даёт ей возможность создавать независимые друг от друга "лаборатории" с самым различным "оснащением". Это позволяет клетке разделять разные (часто мешающие друг другу) метаболические процессы. Так, плотная тубулярная система накапливает внутри себя кальций, который не может находиться в цитоплазме. Концентрация кальция в DTS составляет около 10^{-5} М, что на три порядка выше, чем в цитозоле тромбоцита [39]. На липидной мембране DTS расположен другой кальциевый насос — кальциевая АТФаза саркоплазматического-эндоплазматического ретикулума (SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium transport ATPase, SERCA), — непрерывно закачивающий кальций в DTS, тем самым компенсируя протечки кальция из DTS в цитозоль. На мембране DTS также находятся специальные каналы-рецепторы IP3R. Эти кальциевые каналы могут открываться при появлении в цитозоле клетки специальной молекулы — инозитолтрифосфата (IP3). Открытие этих каналов увеличивает проводимость мембраны DTS для кальция на два-три порядка, приводя к тому, что он начинает выходить из DTS в цитозоль в направлении по градиенту концентрации. Также на внешней мембране клетки есть кальциевые каналы, которые открываются при появлении IP3 или диацилглицерина (DAG) в цитоплазме и впускают кальций внутрь клетки из внешней среды [40]. Всё это приводит к очень быстрому повышению концентрации кальция в цитозоле (характерные времена несколько сотен микросекунд). Однако при значительном повышении концентрации кальция в цитозоле активность PMCA и SERCA также повышается, а каналы IP3R, напротив, начинают закрываться (рис. 5а, б).

Таким образом, в цитозоле клетки при появлении в нём молекул IP3 и/или DAG концентрация кальция может повышаться. Молекулы IP3 и DAG, которые являются важными посредниками в передаче внешних сигналов внутрь клетки, относятся к классу вторичных мессенджеров. Их может производить специальный белок — фосфолипаза C (PLC). Именно на PLC передаются сигналы от разных рецепторов клетки, отслеживающих появление различных сигнальных молекул во внешней среде (см. рис. 4). Как упоминалось, для тромбоцита такими сигнальными молекулами являются тромбин, АДФ и коллаген. Для каждой из этих молекул есть специальный рецептор: для тромбина это PAR1 (рецептор, активируемый протеазами), для АДФ — это P2Y1 (пуринорецептор P2Y 1), а для коллагена — GPVI (гликопротеин VI) [27].

4.2. Простая математическая модель динамики концентрации Ca^{2+} в клетке

На основании описанных молекулярных процессов можно сформулировать базовую математическую модель, отражающую динамику кальция в клетке. На рисунке 5б показаны потоки Ca^{2+} в этой базовой модели. Обозначим через c концентрацию кальция в цитозоле, через c_e — концентрацию кальция в DTS и через p — концентрацию IP3. Будем также рассматривать два состояния IP3R: открытое для прохода кальция и закрытое. Обозначим через h фракцию закрытых каналов-рецепторов IP3R, тогда $1 - h$ будет фракцией открытых

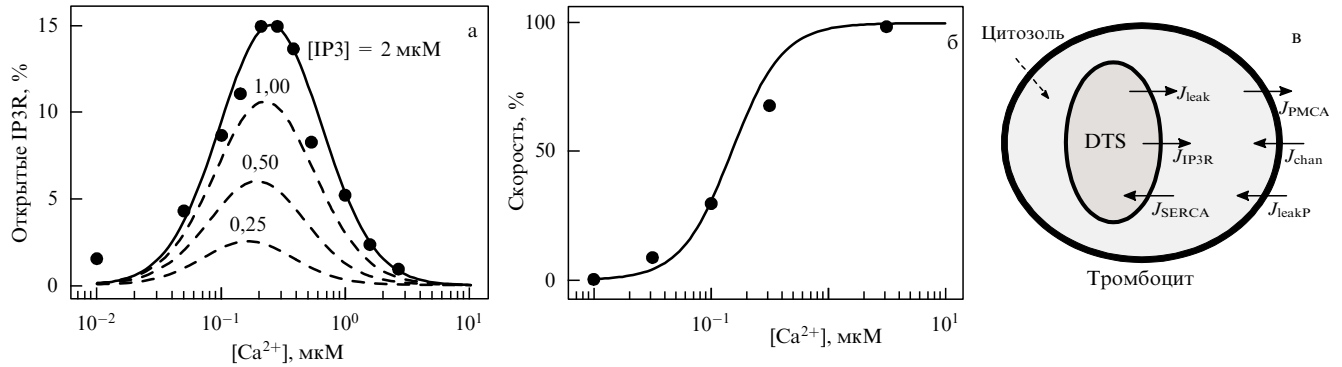


Рис. 5. (а) Зависимость равновесного количества открытых каналов-рецепторов IP3R от концентрации кальция в цитозоле при разных уровнях концентрации IP3. Экспериментальные данные из [41] показаны кружками. (б) Скорость потока кальция через насос SERCA в зависимости от концентрации кальция в цитозоле. Экспериментальные данные из [42] показаны кружками. (в) Схема направлений основных потоков кальция в тромбоците: J_{IP3R} — поток кальция через IP3R, J_{leak} — утечка кальция из DTS в цитозоль, J_{SERCA} — поток через SERCA, J_{chan} — поток через кальциевые каналы во внешней мембране тромбоцита, J_{leakP} — утечка кальция извне в цитозоль клетки, J_{PMCA} — поток кальция через насос PMCA.

для кальция рецепторов. Из DTS кальций может вытекать через каналы-рецепторы IP3R (J_{IP3R}) и в небольшом количестве утекать через мембрану (J_{leak}). Закачивает кальций в DTS насос SERCA (J_{SERCA}). Насос PMCA, выкачивающий кальций вовне, создаёт поток J_{PMCA} . Снаружи кальций может поступать в тромбоцит через различные кальциевые каналы J_{chan} и из-за утечки J_{leakP} . Переходы каналов-рецепторов J_{IP3R} между открытым и закрытым состояниями (т.е. величина h) описываются сложной функцией f , зависящей от концентрации кальция и IP3 в цитоплазме. Через γ обозначим отношение объёма цитозоля к DTS. Таким образом, можно вывести следующую систему уравнений, описывающую динамику кальция в цитозоле:

$$\frac{dc}{dt} = J_{IP3R}(c, c_e, h, p) + J_{leak}(c, c_e) - J_{SERCA}(c, c_e) + J_{chan}(c, p) - J_{leakP}(c) - J_{PMCA}(c), \quad (1)$$

$$\frac{dc_e}{dt} = -\gamma [J_{IP3R}(c, c_e, h, p) + J_{leak}(c, c_e) - J_{SERCA}(c, c_e)], \quad (2)$$

$$\frac{dh}{dt} = f(c, h, p). \quad (3)$$

Для облегчения моделирования и интерпретации результатов сделаем несколько упрощений. Во-первых, несмотря на то что рецепторы IP3R находятся на мембране, т.е. на двумерной поверхности, мы будем полагать их концентрацию трёхмерной. Такое приближение можно считать справедливым, поскольку мембрана DTS имеет очень много выпячиваний и впячиваний [17]. Поэтому находящиеся на мембране DTS каналы-рецепторы IP3R распределены в цитозоле практически равномерно. Также можно считать, что насосы SERCA, PMCA и другие мембранные белки распределены в цитозоле равномерно.

Кроме того, при выводе уравнений (1)–(3) неявно предполагалось, что в небольших клетках ионы Ca²⁺ успевают хорошо перемешаться внутри разных компартментов клетки благодаря диффузии. Исходя из значения коэффициента диффузии кальция внутри клетки $D = 5,3 \times 10^{-6} \text{ см}^2 \text{ с}^{-1}$ [43] можно оценить, что приближение хорошо перемешанной среды в тромбоците справедливо для процессов с характерными временами порядка

5–50 мс. Поскольку характерное время осцилляций концентрации кальция более 1 с, процессами диффузии кальция в тромбоците можно пренебречь.

Предположим также, что тромбоцит является замкнутой по кальцию клеткой — кальций не вытекает из неё и не втекает в неё. Это приближение вполне разумно, поскольку показано, что если работу PMCA и кальциевых каналов на внешней мембране клетки заблокировать, то вид осцилляций при умеренной активации на достаточно больших промежутках времени может практически не изменяться [44]. Все изменения концентрации Ca²⁺ в цитоплазме определяются его перераспределением между цитоплазмой и DTS. Тогда $J_{chan} = J_{leakP} = J_{PMCA} = 0$ и, следовательно, справедлив закон сохранения вещества: $dc/dt = -\gamma^{-1}(dc_e/dt)$. Таким образом, концентрацию c_e можно выразить через соотношение $c(t) + c_e(t)/\gamma = \text{const} = c_{tot}$, где c_{tot} — полная концентрация кальция в тромбоците. Функцию $f(c, h, p)$ также выразим явно. Тогда

$$\frac{dc}{dt} = J_{IP3R} + J_{leak} - J_{SERCA}, \quad (4)$$

$$\frac{dh}{dt} = \frac{h_{\infty} - h}{\tau_h}, \quad (5)$$

где

$$J_{leak} = v_2 [c_{tot} - (1 + \gamma^{-1})c], \quad J_{SERCA} = \frac{v_3 c^2}{K_3^2 + c^2},$$

$$J_{IP3R} = v_1 m_{\infty}^3 h^3 [c_{tot} - (1 + \gamma^{-1})c],$$

$$m_{\infty} = \frac{pc}{(p + d_1)(c + d_5)}, \quad h_{\infty} = \frac{Q_2}{Q_2 + c},$$

$$\tau_h = \frac{1}{a_2(Q_2 + c)}, \quad Q_2 = \frac{p + d_1}{p + d_3} d_2,$$

$v_1 = 6 \text{ с}^{-1}$, $v_2 = 0,11 \text{ с}^{-1}$, $v_3 = 6 \text{ с}^{-1}$, $c_{tot} = 2 \text{ мкМ}$, $\gamma^{-1} = 0,185$, $K_3 = 0,1 \text{ мкМ}$, $d_1 = 0,13 \text{ мкМ}$, $d_2 = 1,049 \text{ мкМ}$, $d_3 = 0,9434 \text{ мкМ}$, $d_5 = 0,08234 \text{ мкМ}$, $a_2 = 0,2 \text{ мкМ}^{-1} \text{ с}^{-1}$.

Система уравнений (4), (5) полностью описывает динамику концентрации кальция в замкнутой по кальцию клетке [45]. На рисунках 6–9 представлена динамика поведения концентрации кальция в этой модели. Рису-

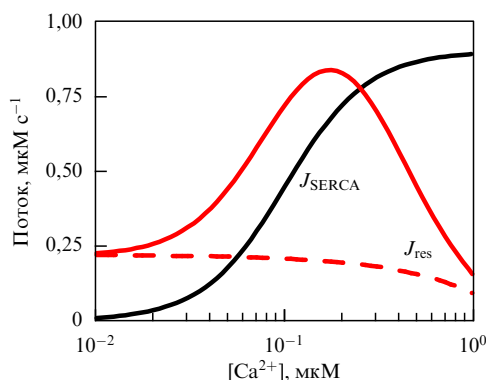


Рис. 6. (В цвете онлайн.) Простейшая модель (4), (5) осцилляций концентрации кальция, в которой внешний сигнал управляет амплитудой колебаний. Зависимость скорости стационарных потоков $J_{\text{res}} = J_{\text{IP3R}} + J_{\text{leak}}$ (красная кривая) и J_{SERCA} (чёрная кривая) от концентрации кальция в цитозоле. Поток J_{res} показан для двух концентраций IP3: 0 (штриховая кривая) и 0,5 мкМ (сплошная кривая). Зависимость J_{res} при любых концентрациях IP3 имеет только одну точку пересечения с J_{SERCA} , в которой скорости выхода кальция из DTS и его закачивания обратно равны, — это положение равновесия.

нок 6 показывает зависимости стационарного тока кальция, поступающего в цитоплазму, $J_{\text{res}} = J_{\text{IP3R}} + J_{\text{leak}}$, и его оттока J_{SERCA} обратно в DTS от концентрации кальция в цитоплазме. Эти зависимости имеют одну точку пересечения, в которой скорости выноса кальция из DTS и его закачивания обратно равны — значит, в этой точке система находится в положении равновесия. Система уравнений (4), (5) двумерна, т.е. её фазовое пространство представляет собой плоскость. На рисунках 7 и 8 показаны фазовые портреты и динамика поведения концентрации кальция в этой системе при разных концентрациях IP3. Изоклина системы $dc/dt = 0$ имеет N-образный вид. При низкой концентрации IP3 изоклина $dh/dt = 0$ пересекает изоклину $dc/dt = 0$ на восходящем участке. В этом случае точка пересечения изоклин, которая является особой точкой системы, представляет собой положение устойчивого равновесия. Поэтому при низких концентрациях IP3 осцилляций в системе не возникает, но возможно появление однократных пиков концентрации кальция. При увеличении концентрации IP3 в некоторый момент изоклина $dh/dt = 0$ начинает пересекать изоклину $dc/dt = 0$ на спадающем участке. В этом случае в системе возникает бифуркация Пуанкаре – Андронова – Хопфа (БХ) (см. приложение 2) и происходит мягкое возбуждение незатухающих осцилляций концентрации кальция — в системе возникает предельный цикл (см. рис. 9). С возрастанием концентрации IP3 амплитуда осцилляций увеличивается до тех пор, пока изоклина $dh/dt = 0$ снова не начнёт пересекать изоклину $dc/dt = 0$ на восходящем участке. Тогда происходит ещё одна бифуркация БХ и предельный цикл исчезает — вместо него появляется устойчивый фокус и осцилляции концентрации кальция становятся затухающими. Таким образом, в рассматриваемой системе в некотором промежутке концентрации IP3 возможно возникновение устойчивых осцилляций концентрации кальция.

4.3. Пороговое поведение системы

Можно отметить важное свойство простейшей модели регуляции концентрации кальция. Модель предсказы-

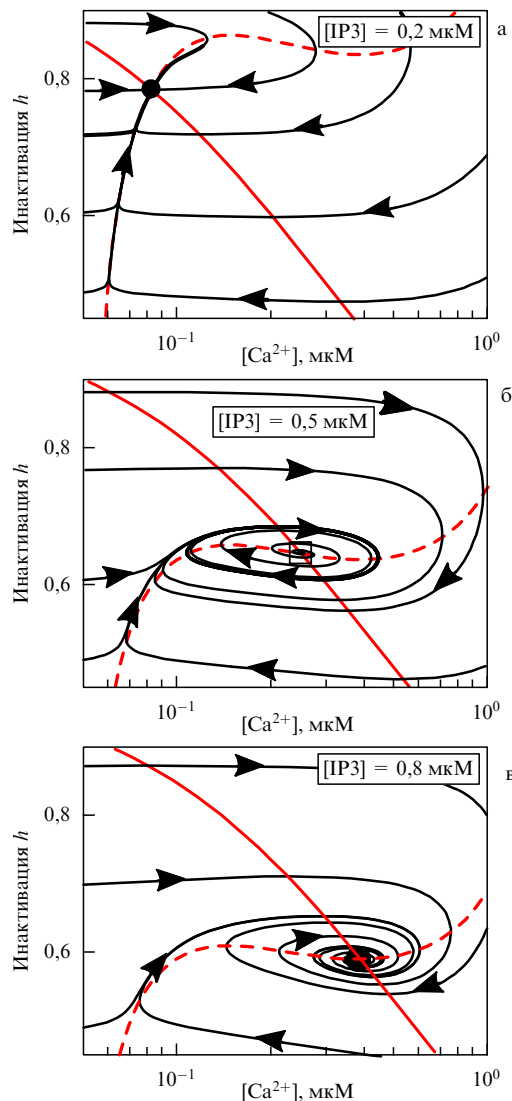


Рис. 7. (В цвете онлайн.) Простейшая модель (4), (5) осцилляций концентрации кальция, в которой внешний сигнал управляет амплитудой колебаний. Фазовые портреты системы при различных значениях концентрации IP3 в цитозоле. Чёрные кривые со стрелками — траектории движения системы, красная штриховая кривая — изоклина $dc/dt = 0$, красная сплошная кривая — изоклина $dh/dt = 0$. При концентрации IP3 0,2 мкМ (а) в системе имеется одно положение равновесия — устойчивый узел. При концентрации IP3 0,5 мкМ (б) реализуется устойчивый предельный цикл. При концентрации IP3 0,8 мкМ (в) в системе имеется устойчивый фокус.

вает, что возрастание концентрации IP3 вплоть до бифуркационного значения мало влияет на стационарную концентрацию Ca^{2+} в клетке. И только при достижении порогового значения уровня IP3 клетка скачком меняет своё состояние. Стационарное состояние сменяется неустойчивым, и начинаются осцилляции концентрации кальция, которые значительно повышают концентрацию кальция в цитозоле клетки на небольшое время. Этот механизм по своей природе сходен с ответом типа "всё или ничего" — низкий уровень активатора полностью игнорируется клеткой, но при преодолении некоторого порогового уровня активатора происходит бифуркация и клетка скачком меняет характер своего ответа на внешний сигнал. Из молекулярных механизмов передачи сигнала в клетке (описанных в

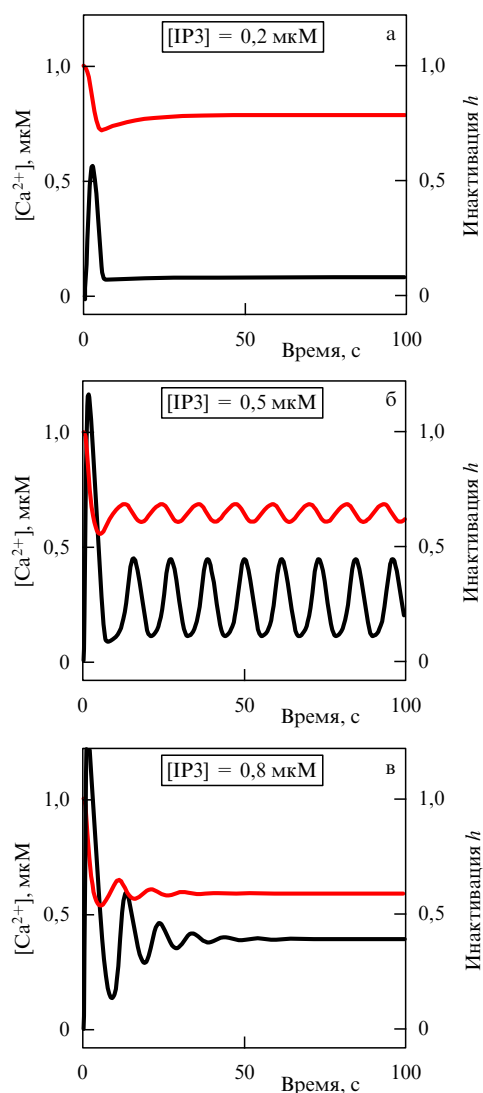


Рис. 8. (В цвете онлайн.) Простейшая модель (4), (5) осцилляций концентрации кальция, в которой внешний сигнал управляет амплитудой колебаний. Динамика концентрации кальция (чёрная кривая) во времени и переменной h (обозначающей инактивацию IP3R, красная кривая) во времени при концентрациях IP3 0,2 мкМ (а), 0,5 мкМ (б) и 0,8 мкМ (в).

разделе 3) известно, что IP3 начинает производиться в клетке при появлении некоторого внешнего активатора. Следовательно, существует некий диапазон концентраций активатора, на который клетка не будет реагировать, поскольку он практически не повысит уровень кальция в цитозоле. При очень большой концентрации активатора колебания прекращаются и концентрация кальция выходит на новое стационарное состояние, при котором в клетке устанавливается стабильно высокий уровень Ca^{2+} .

Впервые механизм возникновения осцилляций концентрации Ca^{2+} через бифуркацию БХ был продемонстрирован в работе [46]. В последующих работах этот механизм был подтверждён для многих клеток [30].

4.4. Как клетка управляет частотой колебаний концентрации Ca^{2+}

Главным недостатком простой модели осцилляций концентрации кальция является отсутствие зависимости частоты колебаний от концентрации IP3 (рис. 9б). Харак-

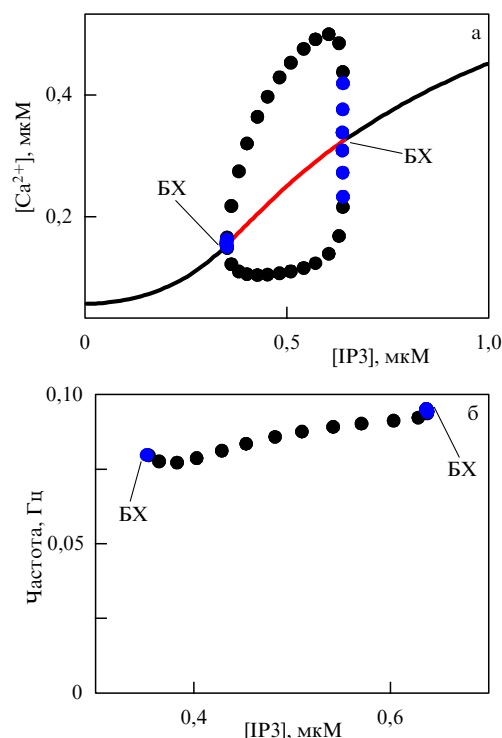


Рис. 9. (В цвете онлайн.) Простейшая модель (4), (5) осцилляций концентрации кальция, в которой внешний сигнал управляет амплитудой колебаний. Бифуркационные диаграммы. Сплошной чёрной кривой показано устойчивое положение равновесия системы, красной кривой — неустойчивое положение равновесия. Синими кружками показана амплитуда неустойчивых кальциевых осцилляций, а чёрными кружками — амплитуда устойчивых осцилляций концентрации кальция. (а) При увеличении концентрации IP3 в цитозоле в системе происходит бифуркация Пуанкаре–Андропова–Хопфа (БХ) — устойчивая точка теряет устойчивость, возникает предельный цикл и происходит мягкое возбуждение осцилляций. При дальнейшем увеличении концентрации IP3 величина осцилляций возрастает — предельный цикл увеличивается в размерах. При достижении некоторой концентрации IP3 в системе снова происходит бифуркация Пуанкаре–Андропова–Хопфа, которая превращает устойчивый предельный цикл в устойчивый фокус. (б) Частота осцилляций концентрации кальция в зависимости от концентрации IP3. Эта частота изменяется слабо.

тер бифуркаций и колебаний сильно изменяется, если предположить, что наше описание работы кальциевого насоса неточно. Это описание получено на выделенном из клетки белке. Вполне возможно, что в клетке насос действует несколько иначе: множество белков может вносить небольшие изменения в работу насоса SERCA. При небольшом изменении параметра K_3 , отвечающего за работу насоса SERCA [45], фазовый портрет системы сильно изменяется. При $K_3 = 0,04$ мкМ происходит сдвиг зависимости J_{SERCA} влево, приводя к тому, что вместо одной особой точки возникает три (рис. 10). Это значительно изменяет характер динамики концентрации кальция. Вначале, когда концентрация IP3 низка, в этой системе, как и в предыдущей, есть одно положение равновесия, в котором изоклина $dh/dt = 0$ пересекает N-образную изоклину на восходящем участке, и, следовательно, это положение равновесия устойчиво (рис. 11, 12). Здесь также могут возникать единичные пики концентрации кальция.

При увеличении концентрации IP3 в системе происходит бифуркация рождения пары особых точек: появ-

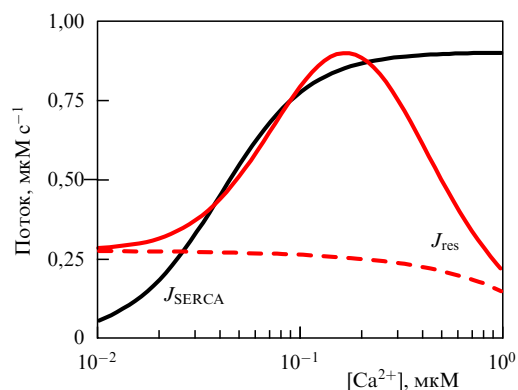


Рис. 10. (В цвете онлайн.) Модель осцилляций концентрации кальция, в которой внешний сигнал управляет частотой колебаний. Зависимости стационарной скорости потоков $J_{res} = J_{IP3R} + J_{leak}$ (красные кривые) и J_{SERCA} (чёрная кривая) от концентрации кальция в цитозоле. Поток J_{res} показан для двух концентраций IP3: 0 (штриховая кривая) и 0,4 мкМ (сплошная кривая). Из-за изменения параметра K_3 зависимость J_{SERCA} (чёрная кривая) сдвинулась влево (по сравнению с зависимостью J_{SERCA} на рис. 6), вследствие чего образовались ещё две точки пересечения.

ляются седло и неустойчивый фокус. Однако это не меняет устойчивости системы в целом, поскольку существовавшая особая точка никуда не делась — в системе сохраняется единственное устойчивое положение равновесия, в которое попадают все траектории системы. С возрастанием концентрации IP3 эта устойчивая особая

точка постепенно сдвигается вправо и проходит через максимум на N-образной изоклине $dc/dt = 0$, а затем начинает пересекать эту изоклину на нисходящем участке. В момент прохождения максимума это положение равновесия теряет устойчивость. Происходит сложная бифуркация рождения большого устойчивого предельного цикла, охватывающего область существования двух неустойчивых фокусов, разделённых седлом, т.е. охватывающего сразу все три особые точки системы. В системе происходит жёсткое возбуждение колебаний с большой амплитудой. Характер движения по предельному циклу сильно нелинеен. Система медленно движется по левой ветви изоклины, что соответствует низкой концентрации Ca^{2+} и медленному открытию пор в DTS. После достижения максимума изоклины траектория срывается: концентрация Ca^{2+} начинает быстро возрастать, достигает максимума и довольно быстро убывает до тех пор, пока траектория опять не попадёт на левую ветвь изоклины. Таким образом формируется характерный Ca^{2+} -ответ, который состоит из короткого импульса большой амплитуды, сменяющегося длительным промежутком времени, в течение которого концентрация Ca^{2+} очень низка.

При дальнейшем увеличении концентрации IP3 самая правая неустойчивая точка передвигается на правый восходящий участок изоклины $dc/dt = 0$. В этот момент в системе происходит ещё одна бифуркация БХ и внутри устойчивого предельного цикла возникает неустойчивый. Неустойчивый предельный цикл увеличивается в размерах до тех пор, пока не поглощает устойчивый предельный цикл, вследствие чего в системе остаётся только

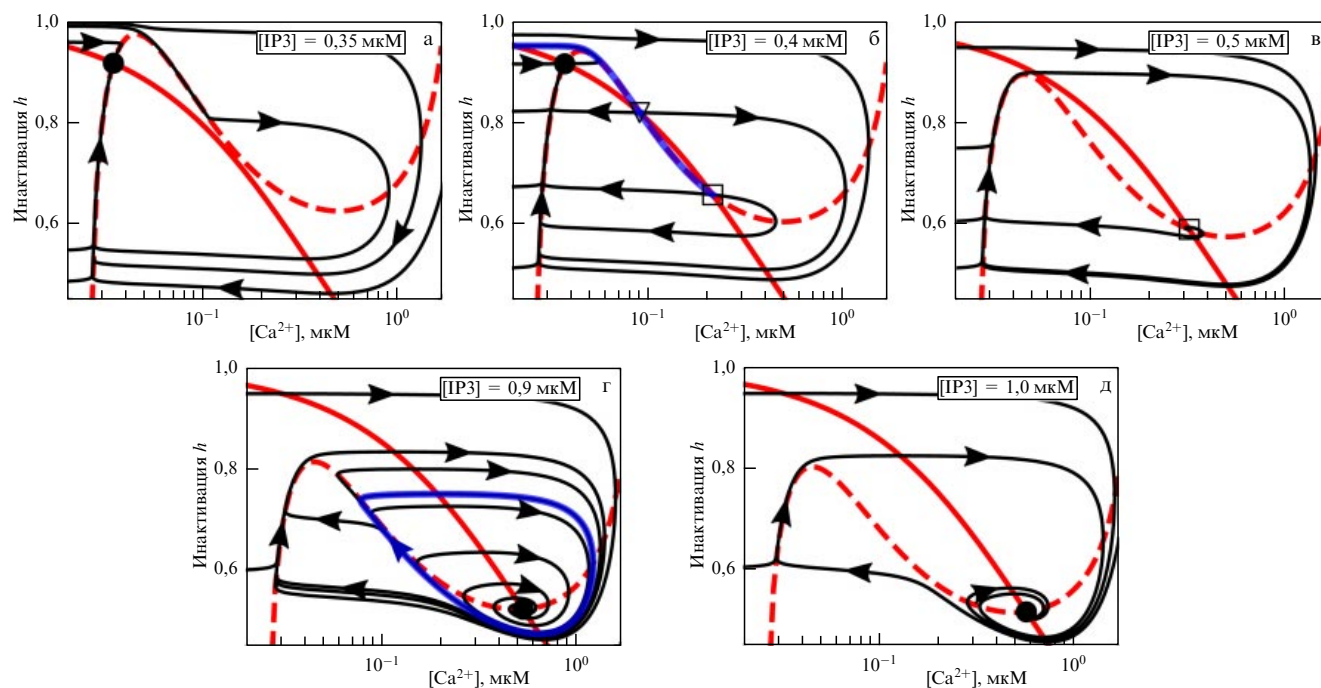


Рис. 11. (В цвете онлайн.) Модель осцилляций концентрации кальция, в которой сигнал управляет частотой колебаний. Фазовые портреты системы при концентрации IP3 0,35 мкМ (а), 0,4 мкМ (б), 0,5 мкМ (в), 0,9 мкМ (г) и 1,0 мкМ (д) в цитозоле. Чёрные кривые со стрелками показывают траектории движения системы, красная штриховая кривая — изоклина $dc/dt = 0$, сплошная красная кривая — изоклина $dh/dt = 0$. При концентрации IP3 0,35 мкМ (а) в системе имеется одно положение равновесия — устойчивый узел. При концентрации IP3 0,4 мкМ (б) в системе появляются ещё две особые точки: седло (треугольник) и неустойчивый узел (квадрат). Сепаратриса (синяя кривая) обозначает входящие ветви седла. При увеличении концентрации IP3 до 0,5 мкМ (в) исчезают две особые точки, остаётся неустойчивый фокус, вокруг которого образуется устойчивый предельный цикл. При концентрации IP3 0,9 мкМ (г) в системе имеются два предельных цикла — в устойчивом предельном цикле возникает неустойчивый предельный цикл (который является сепаратрисой (синяя кривая)). При концентрации IP3 1,0 мкМ (д) в системе остаётся только устойчивый фокус.

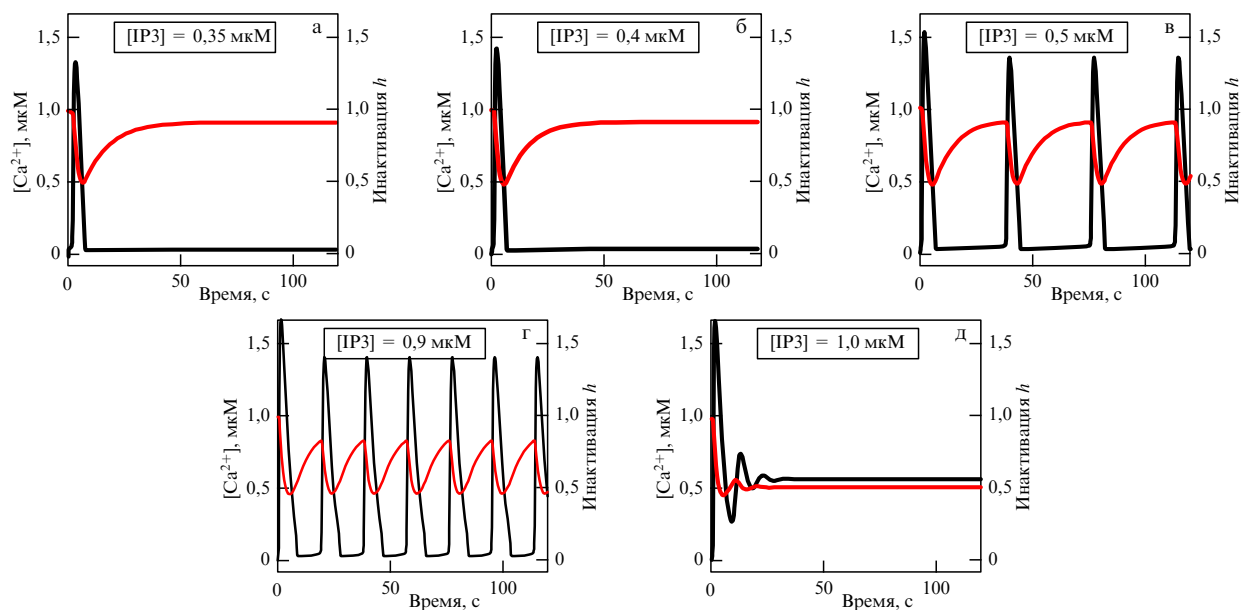


Рис. 12. (В цвете онлайн.) Модель осцилляций концентрации кальция, в которой сигнал управляет частотой колебаний. Динамика концентрации кальция (чёрная кривая) и переменной h (обозначающей инактивацию IP3R) (красная кривая) во времени при концентрациях IP3: 0,35 мкМ (а), 0,4 мкМ (б), 0,5 мкМ (в), 0,9 мкМ (г) и 1,0 мкМ (д).

устойчивый фокус — осцилляции концентрации кальция становятся затухающими.

Рассматриваемая динамика концентрации кальция кардинально отличается от динамики, представленной на рис. 6–9. Во-первых, в этом случае происходит жёсткое возбуждение колебаний концентрации кальция. Во-вторых, в этой системе амплитуда осцилляций кальция не изменяется, но изменяется частота осцилляций (рис. 13б). Первое связано с тем, что в системе происходит жёсткое возбуждение колебаний, а второе — с тем, что с увеличением концентрации IP3 уменьшается размер восходящего участка изоклины $dc/dt = 0$ (траектории в левой части рис. 13а, б, направленные вверх), по которому происходит самое медленное движение траекторий системы.

4.5. Стохастическая составляющая осцилляций концентрации Ca^{2+}

Сравнивая полученные в модели колебания (см. рис. 12) с экспериментальными данными, мы видим серьёзное различие. Колебания есть в обоих случаях, но модель предсказывает регулярные осцилляции с постоянными амплитудой и частотой, тогда как в эксперименте наблюдается сильно выраженная стохастичность, особенно в ответе системы на слабые активаторы. По экспериментальным данным трудно однозначно выделить амплитуду и частоту колебаний концентрации кальция: они кажутся случайными. Общепринятым на сегодня объяснением стохастичности осцилляций концентрации кальция в тромбоците считаются малый объём последнего ($\sim 10^{-15}$ л) и, соответственно, малое число содержащихся в нём ионов. Например, в таком объёме в норме будет находиться около 50 ионов кальция.

При таких малых количествах ионов кальция могут происходить флуктуации, влияющие на динамику осцилляций. Поэтому моделировать такие процессы с помощью обыкновенных дифференциальных уравнений нельзя. Эти процессы описывают стохастическими уравнениями. Алгоритм Гиллеспи [47] позволяет получать

статистически правильную траекторию (являющуюся одним из возможных решений основного кинетического уравнения) для стохастического уравнения. Физическое основание алгоритма — столкновение молекул в сосуде с реагентом. Исходя из значений вероятности таких столкновений алгоритм выбирает реакцию, которая должна произойти в некоторый момент времени. Если задать вероятности "столкновения молекул" потоками, как в системе (4), (5), то с помощью моделирования можно получить набор траекторий концентрации кальция при различных концентрациях IP3. Две типичные траектории показаны на рис. 14. Видно, что результаты расчёта соответствуют экспериментальным данным. Однако в больших клетках таких стохастических колебаний концентрации кальция не наблюдается. Более того, в настоящее время считается, что клетки стараются подавлять динамический хаос, который может возникать в их метаболических системах [48].

4.6. Детальное моделирование динамики Ca^{2+} в клетке

При получении результатов, представленных на рис. 6–14, мы пользовались, как отмечено в разделе 4.2, некоторыми приближениями. Так, мы предположили, что клетка является закрытой по кальцию. Также мы использовали упрощённое уравнение, описывающее динамику открытия и закрытия IP3R (динамику h). Сегодня в основном все сходится во мнении, что канал-рецептор IP3R может находиться в шести различных состояниях, между которыми возможны разные переходы, в зависимости от концентрации кальция и IP3. Одна из таких моделей, учитывающих сложную динамику переходов IP3R и открытость клетки по кальцию, описана в приложении 3. Однако основные особенности динамики концентрации кальция в этой сложной модели сохраняются — в ней также имеется порог по возникновению осцилляций, который тоже связан с бифуркацией БХ. В данной модели также происходит жёсткое возбуждение осцилляций концентрации кальция. Увеличение

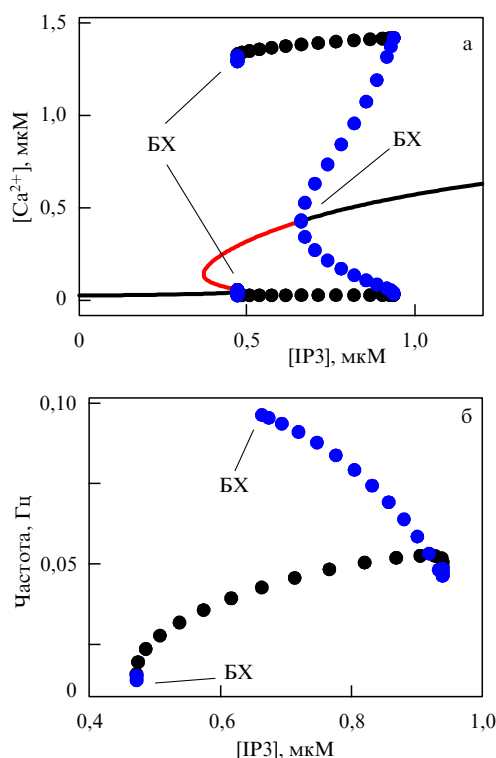


Рис. 13. (В цвете онлайн.) Модель осцилляций концентрации кальция, в которой сигнал управляет частотой колебаний. Бифуркационные диаграммы. Сплошной чёрной кривой показано устойчивое положение равновесия системы, красной кривой — неустойчивое положение равновесия. Синими кружками показана амплитуда кальциевых неустойчивых осцилляций концентрации кальция, чёрными кружками — амплитуда устойчивых осцилляций концентрации кальция. (а) При увеличении концентрации IP3 в системе сначала образуются два неустойчивых состояния. Затем возникает бифуркация Пуанкаре — Андронова — Хопфа — появляется предельный цикл и происходит жёсткое возбуждение осцилляций концентрации кальция. При этом их амплитуда практически не изменяется. При достижении некоторой концентрации IP3 в системе снова происходит бифуркация Пуанкаре — Андронова — Хопфа и внутри устойчивого предельного цикла возникает неустойчивый цикл, который увеличивается в размерах, до тех пор пока не поглотит устойчивый предельный цикл, в результате чего в системе остаётся только устойчивый фокус. (б) Частота осцилляций концентрации кальция увеличивается при возрастании концентрации IP3.

концентрации IP3 в этой модели приводит к увеличению частоты колебаний концентрации кальция, даже ещё более крутому, чем на рис. 13. Кроме того, было показано, что в клетке имеются положительные и отрицательные обратные связи, которые могут изменять форму осцилляций концентрации кальция [49].

Ещё одно приближение связано с быстрым выравниванием концентрации во всей клетке из-за быстрой диффузии кальция в цитозоле клетки. Это приближение вполне справедливо для таких малых клеток, как тромбоцит, но оно становится неверным для больших клеток, например для нейронов и ооцитов. В этих клетках также возникают осцилляции концентрации кальция. Для таких больших клеток область, в которой произошла активация клетки, изначально невелика. Так, например, в большом ооците активацию запускает маленький сперматозоид, который входит в небольшую часть ооцита. В нейроне активацию запускает отросток другого нейрона, который связан с первым очень небольшим контактом —

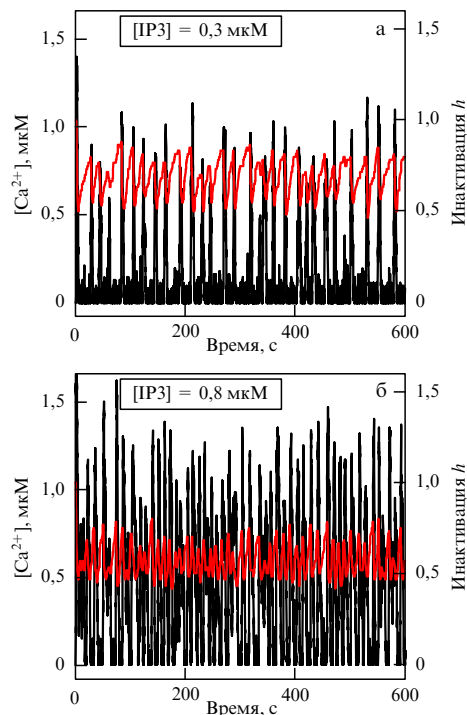


Рис. 14. Модель осцилляций концентрации кальция, в которой сигнал управляет частотой колебаний. Стохастическое моделирование осцилляций концентрации кальция в простейшей модели методом Гиллеспи [47]. Вследствие очень малого числа свободных ионов кальция (около 50) в неактивированном тромбоците флуктуации концентрации кальция в цитоплазме будут приводить к возникновению редких скачков концентрации кальция уже при концентрации IP3 0,3 мкМ (а). С повышением концентрации IP3 до 0,8 мкМ (б) количество этих скачков концентрации Ca^{2+} увеличивается. Чёрная кривая отражает концентрацию Ca^{2+} , красная — инактивацию рецепторов h .

синапсом. Одним из очень красивых результатов осцилляций концентрации кальция в больших клетках является возникновение пространственных автоволн концентрации кальция — от места активации во все стороны клетки начинают распространяться самоподдерживающиеся волны концентрации кальция, которые периодически открывают рецепторы-каналы IP3R, а затем закрывают их. Однако мы не можем здесь подробно осветить этот красивый результат и отсылаем читателя к отличной книге [50].

5. Расшифровка кальциевого сигнала в клетке

Итак, математическое моделирование и экспериментальные результаты показывают, каким образом разные агонисты могут вызывать в клетках осцилляции концентрации кальция с разной частотой. А именно, всё зависит от концентрации IP3, вырабатываемого PLC. При повышении концентрации IP3 происходит пороговое включение осцилляций концентрации кальция, амплитуда и частота которых зависят от концентрации IP3. Как описано выше (см. рис. 4), тромбоциты имеют рецепторы к коллагену, АДФ и тромбину. Все эти рецепторы передают активирующий сигнал на PLC (см. рис. 4). Но каждый из таких рецепторов передаёт на PLC сигналы разной силы. Поэтому каждый из внеклеточных сигналов приводит к разным частотам осцилляций концентрации кальция внутри тромбоцита. Теперь тром-

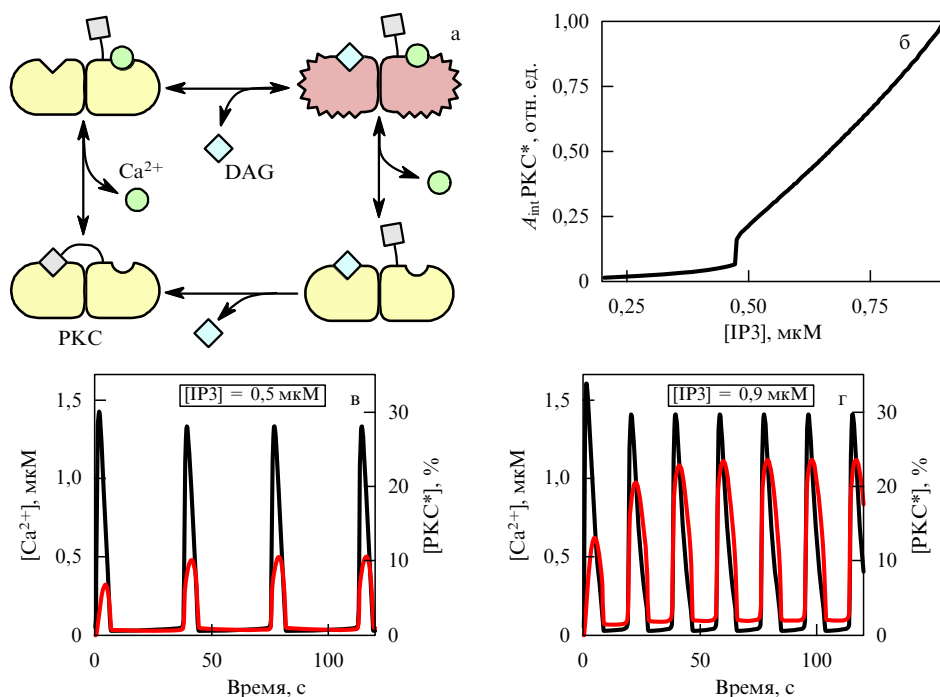


Рис. 15. (В цвете онлайн.) Расшифровка частоты осцилляций концентрации кальция с помощью белка PKC. (а) Схема активации PKC. Неактивированный PKC показан жёлтым цветом, активированный — красным. PKC* обозначает активированную форму PKC, связавшую кальций и DAG. PKC имеет два домена, которые связывают кальций и DAG. Домен для связывания DAG закрыт до момента связывания кальция с PKC. Когда PKC связывает и кальций, и DAG, он становится активным. Если кальций выйдет из домена активированной PKC, то домен для DAG всё ещё в течение некоторого времени будет связан с DAG. Однако этот белок не может связывать новую молекулу DAG до тех пор, пока он не свяжется с кальцием — его домен для связывания DAG закрыт. При связывании с кальцием его домен для DAG освобождается. Но связывание с DAG происходит достаточно медленно. При снижении концентрации кальция в цитозоле кальций будет отсоединяться от PKC, но при этом отсоединение PKC от DAG происходит не сразу. Повышение концентрации кальция в цитозоле может быстро восстановить активность PKC. (б) Интегральная активность (A_{int}) PKC в зависимости от концентрации IP3. Использована модель осцилляций концентрации кальция, дающая частотную модуляцию. (в, г) Примеры динамики активации PKC при концентрации IP3 0,5 μM (в) и 0,9 μM (г).

боцит может "различать" АДФ, коллаген и тромбин и при этом отфильтровывать слабые сигналы. Кстати, судя по литературным данным, тромбоцит выставляет на порядок больше рецепторов PAR, чем P2Y1 [17]. Видимо, за счёт этого сигнал от рецепторов к тромбину получается гораздо сильнее, чем сигнал от АДФ.

Но клетке необходимо также каким-то образом преобразовать импульсный сигнал в активацию правильных белков для адекватного ответа на стимул. Понимание того, как клетка это может осуществить (особенно в условиях, когда возможны стохастические осцилляции), в настоящее время практически полностью отсутствует. Рассмотрим предполагаемые на сегодня гипотезы о механизмах дешифровки Ca^{2+} -сигнала.

Одним из белков, который может расшифровывать частоту осцилляций концентрации кальция, является протеинкиназа C (PKC) [51, 52]. PKC может изменять активность других белков посредством их ковалентной модификации — PKC ковалентно "пришивает" к ним фосфат, что может либо ингибировать, либо активировать белки [53]. Белок PKC достаточно хитро устроен (рис. 15а). У него есть два домена, одним он может связывать кальций, а другим — молекулу DAG, которая, как указывалось, производится белком PLC одновременно с IP3. Для того чтобы PKC стал активным и начал модифицировать другие белки, ему необходимо связать и кальций, и DAG. Всё начинается с того, что PKC связывает кальций. Это обусловлено тем, что сайт для связывания DAG откры-

вается только тогда, когда PKC уже связал кальций. При повышении концентрации кальция в цитоплазме клетки связывание кальция с кальциевым доменом PKC происходит достаточно быстро. Довольно быстро происходит и выход кальция из связывающего домена при снижении концентрации кальция в цитозоле. Когда PKC связал кальций, открывается домен для DAG и начинается достаточно медленное связывание молекул DAG. При этом, хотя связывание достаточно медленное, оно является достаточно крепким — если концентрация кальция в цитозоле снизится и ион Ca^{2+} выйдет из кальциевого домена PKC, то PKC всё равно ещё будет связывать DAG в течение некоторого времени и сайт связывания DAG не сможет закрыться. Если в этот момент концентрация кальция снова возрастёт, то кальций опять войдёт в кальциевый домен и PKC быстро активируется. Но если PKC успеет потерять DAG, то домен для DAG закроется и для активации надо будет всё начинать заново — связывать кальций и долго связывать DAG. Такое устройство PKC делает её активность чувствительной к частоте осцилляций концентрации кальция.

Это означает, что если осцилляции концентрации кальция будут достаточно частыми, то PKC в основном будет находиться в активированном состоянии; при редких осцилляциях концентрации кальция PKC будет пребывать главным образом в инактивированном состоянии. Зависимость интегральной активности PKC от концентрации IP3 для частотно-модулируемых колеба-

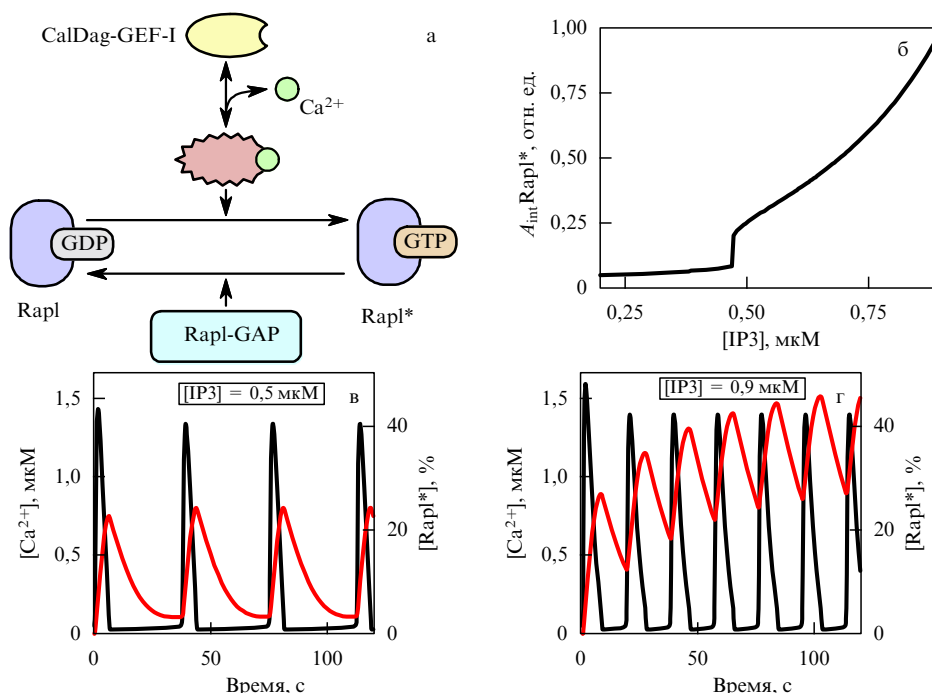


Рис. 16. (В цвете онлайн.) Расшифровка частоты осцилляций концентрации кальция с помощью белка CalDag-GEF-I. (а) Схема активации белка Rap1. Изначально Rap1 находится в выключенном состоянии. В этом состоянии с белком Rap1 связана молекула GDP. CalDag-GEF-I имеет домен связывания кальция. Неактивный белок CalDag-GEF-I (показан желтым) может связывать кальций и активироваться (активированный CalDag-GEF-I показан красным). Активированный CalDag-GEF-I может активировать Rap1, производя в нём замену молекулы GDP молекулой GTP. Белок Rap1-GAP активен постоянно и инактивирует Rap1-GTP заменой GTP молекулой GDP. (б) Интегральная активность (A_{int}) Rap1-GTP (обозначен как Rap1*) в зависимости от концентрации IP3. Использована модель осцилляций концентрации кальция, дающая частотную модуляцию. (в, г) Примеры динамики активации Rap1 при концентрации IP3 0,5 мкМ (в) и 0,9 мкМ (г).

ний концентрации кальция показана на рис. 156. Как видно из рисунка, с увеличением концентрации IP3 интегральная активность РКС возрастает линейно. Примеры динамики активации РКС при разных концентрациях IP3 показаны на рис. 15в, г.

Ещё одним белком, чувствительным к частоте осцилляций концентрации Ca²⁺, является белок "фактор обмена гуанина I, регулируемый кальцием и DAG" (CalDag-GEF-I) [54, 55]. Активность этого белка, несмотря на такое его название, никак не зависит от DAG, но зависит от концентрации кальция. Этот белок работает в связке с двумя другими белками: "Ras-родственным белком 1" Rap1 и "активирующим ГТФазную активность Rap1-белком" (Rap1-GAP2) (рис. 16а). Белок Rap1 играет роль переключателя, который может активировать другие белки. В выключенном состоянии Rap1 связывает молекулу гуанозиндифосфата (GDP). Белок CalDag-GEF-I имеет домен для связывания кальция и активируется при повышении его концентрации. Активированный CalDag-GEF-I связывается с Rap1-GDP и заменяет в нём GDP гуанозинтрифосфатом (GTP). Rap1-GTP переходит во включённое состояние и начинает влиять на активность других белков. Белок Rap1-GAP2 может связываться с Rap1-GTP и выключать его с помощью замены GTP → GDP.

При редких колебаниях концентрации кальция активность CalDag-GEF-I может быть компенсирована активностью Rap1-GAP2. Но при достаточно частых осцилляциях концентрации кальция Rap1-GAP2 не будет успевать выключать CalDag-GEF-I и начнётся постепенная активация Rap1. Интегральная активность Rap1-GTP в зависимости от концентрации IP3 для частотно-модулируемых

колебаний концентрации кальция показана на рис. 16б. Примеры динамики активации Rap1 при разных концентрациях IP3 приведены на рис. 16в, г. В обоих рассмотренных примерах имеется схожая зависимость от концентрации Ca²⁺, но второй процесс вовлекает в ответ на изменение концентрации Ca²⁺ множество разных белков, и, как следствие, множество разных метаболических систем.

Митохондрии в клетках также могут дешифровать осцилляции концентрации кальция [56, 57]. Эти клеточные компартменты имеют специальные насосы, закачивающие кальций внутрь. Концентрация кальция в митохондриях влияет на скорость производства энергии (АТФ) в клетке. Интересная особенность заключается в том, что при слишком большой частоте (и, возможно, амплитуде) колебаний концентрации Ca²⁺ митохондрии начинают накапливать внутри себя слишком много кальция [37, 58]. Последнее приводит к их перегрузке, и производство энергии в клетке прекращается. По-видимому, это есть переход в третье, прокоагулянтное, состояние [59, 60], в котором клетка находится на пути к гибели. Она раздувается в шар и теряет асимметрию распределения молекул мембраны, что сильно способствует активации финальных стадий процесса формирования тромба и остановке его роста. Пока это самая плохо изученная стадия процесса свёртывания крови.

6. Заключение

Активация тромбоцитов крови сопровождается возникновением осцилляций концентрации ионов кальция в цитозоле, которые выполняют функции передатчика информации от мембраны клетки внутрь неё. Вход

ионов кальция в цитозоль тромбоцита, индуцированный рядом рецепторов на мембране клетки, является центральным событием в процессе активации. Интересная особенность тромбоцитов заключается в том, что практически все внешние сигналы сходятся в клетке на один приёмник — систему генерации кальциевых осцилляций. Суммарная сила входных сигналов преобразуется в почти пропорциональное увеличение частоты осцилляций. Благодаря развитию методов биохимии и микроскопии появилась возможность наблюдать с высоким разрешением осцилляции концентрации кальция в одиночных тромбоцитах. Анализ механизмов развития осцилляций методами нелинейной динамики показывает, что в клетке реализован специальный динамический осциллятор с жёстким возбуждением колебаний. Это приводит к тому, что ответ клетки оказывается пороговым, что представляет собой крайне важное биологическое свойство, позволяющее клетке не реагировать на случайные флуктуации. Другая особенность этой динамической системы состоит в том, что жёсткое возбуждение колебаний позволяет обеспечить практически линейное возрастание частоты колебаний в ответ на увеличение входных сигналов. В свою очередь последовательное увеличение частоты колебаний в ответ на всё более сильные активирующие сигналы позволяет клетке последовательно включать всё больше разных систем, необходимых для надёжной работы системы свёртывания крови.

Благодарности. Авторы признательны М.А. Пантелееву, В.В. Мустяце и А.А. Мартянову за плодотворные обсуждения данной работы. Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхпроизводительными вычислительными ресурсами Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Работа поддержана Российским научным фондом (грант 17-74-20045).

Приложение 1. Как наблюдают за концентрацией кальция в тромбоците

На сегодняшний день самым удобным и точным инструментом для наблюдения за изменением концентрации

кальция внутри тромбоцита является флуоресцентный микроскоп. Современные флуоресцентные микроскопы используют эпи-подсветку (epi-illumination), при которой свет возбуждения освещает образец через тот же объектив, который применяется для изображения эмиссии флуоресценции. Разделение света возбуждения флуоресценции и её испускания производится дихроическим зеркалом, которое отражает коротковолновый свет возбуждения, но пропускает свет флуоресценции с большей длиной волны на видеокамеру (рис. 17а). Качество современных дихроических зеркал потрясает. Две длины волны, различающиеся всего на 10 нм, такое зеркало разделяет практически со 100%-ной эффективностью. Большой прогресс в увеличении эффективности флуоресцентных микроскопов связан также с использованием лазеров для возбуждения флуоресценции и появлением сверхчувствительных и стабильных ПЗС-камер (ПЗС — прибор с зарядовой связью). Однако все эти достоинства микроскопов бесполезны, если нет зонда — молекулы, способной входить в клетку и связывать Ca, изменяя при этом свою флуоресценцию. Наблюдать за изменением концентрации кальция в одиночной клетке стало возможным только с изобретением таких флуорофоров, как например, молекула Fura-Red, химическая структура которой показана на рис. 17в. Связывание кальция с молекулой Fura-Red приводит к смещению её спектра возбуждения и эмиссии (такие флуорофоры называются ратиометрическими). На рисунке 17б показаны спектры возбуждения (штриховая кривая) и эмиссии (сплошная кривая) для молекулы Fura-Red в связанном с кальцием состоянии (оранжевая кривая) и в состоянии, свободном от кальция (синяя кривая). Концентрация кальция в клетке вычисляется из отношения значений интенсивностей флуоресценции на двух длинах волн, λ_1 и λ_2 . Для пересчёта интенсивности эмиссии ратиометрического флуорофора в концентрацию кальция в клетке используют формулу [61]

$$[Ca^{2+}] = \beta K_d \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R},$$

где R — отношение интенсивности флуоресценции ратиометрического зонда на длине волны λ_1 к интенсивности его флуоресценции на длине волны λ_2 ; $R_{\min}$ и $R_{\max}$ —

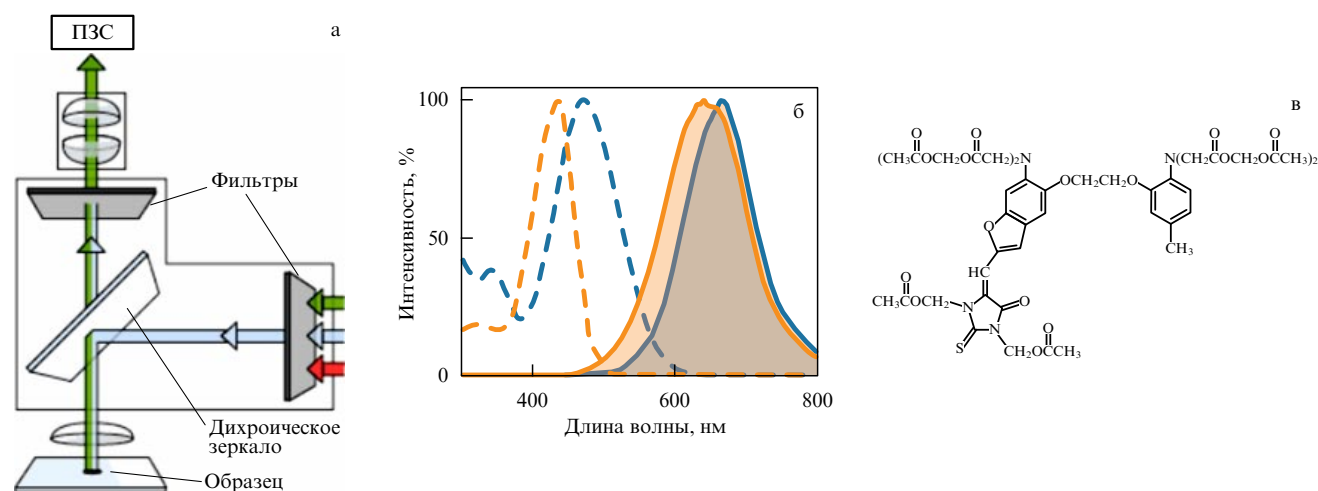


Рис. 17. (В цвете онлайн.) (а) Схема флуоресцентного микроскопа. (б) Спектры возбуждения (штриховая кривая) и эмиссии (сплошная кривая) для молекулы Fura-Red в связанном с кальцием состоянии (оранжевая кривая) и в состоянии, свободном от кальция (синяя кривая). (в) Химическая структура молекулы Fura-Red.

минимальная и максимальная относительные интенсивности флуоресценции красителя; K_d — константа диссоциации зонда; β — нормировочная величина, равная отношению интенсивностей флуоресценции зонда при нулевой и насыщающей концентрациях кальция.

Молекулы Fura-Red попадают внутрь клетки следующим образом: карбоксильные группы Fura-Red модифицируют эфирными ацетооксиметильными группами, в результате чего молекула становится незаряженной и гидрофобной. В таком виде она может проходить через липидные мембраны клеток. Когда Fura-Red попадает внутрь клетки, клеточные белки (эстеразы) "откусывают" от неё липофильные группы, вследствие чего молекула становится заряженной и теряет способность проходить через липидные мембраны клеток.

К другому типу связывающих кальций флуорофоров относится Fura-2. Связывание с кальцием не приводит к смещению спектра эмиссии у Fura-2, но в несколько раз увеличивает интенсивность флуоресценции (такие флуорофоры называют нератиометрическими). В этом случае концентрация кальция в клетке вычисляется по изменению интенсивности флуоресценции флуорофора. Fura-2 попадает в клетку так же, как и Fura-Red. В случае нератиометрического флуорофора концентрацию кальция в клетке определяют как [61]

$$[Ca^{2+}] = K_d \frac{F - F_{\min}}{F_{\max} - F},$$

где F — уровень флуоресценции нератиометрического зонда, $F_{\min}$ и $F_{\max}$ — минимальный и максимальный уровни флуоресценции красителя.

Приложение 2.

Бифуркация Пуанкаре – Андронова – Хопфа

Допустим, что некоторая система приходит к равновесию через экспоненциально затухающие осцилляции (рис. 18а). Другими словами, небольшое возмущение в системе затухает после непродолжительных колебаний. Предположим, что скорость затухания колебаний зависит от параметра μ . Если при изменении μ затухание осцилляций уменьшается, то при некотором бифуркационном μ_c затухание сменится возрастанием амплитуды осцилляций (рис. 18б). Если при этом амплитуда колебаний будет возрастать до некоторого максимального значения, то говорят, что в системе произошла бифуркация Пуанкаре – Андронова – Хопфа. Или, если говорить в терминах фазовых потоков, бифуркация Пуанкаре – Андронова – Хопфа происходит тогда, когда устойчивый фокус (рис. 18в) сменяется неустойчивым, вокруг которого рождается устойчивый предельный цикл (рис. 18г).

Описанный выше тип возбуждения колебаний называется мягким (рис. 18в, г). Возможно и жесткое возбуждение колебаний (рис. 18д, е). В последнем случае в системе происходит рождение двух предельных циклов: устойчивого и вложенного в него неустойчивого. Внутри этой пары предельных циклов может существовать устойчивая особая точка. По мере приближения значения параметра к бифуркационному неустойчивый предельный цикл стягивается к фокусу. При бифуркационном значении параметра устойчивый фокус теряет устойчивость из-за попадания в него неустойчивого предельного цикла (пунктирная кривая на рис. 18д). Фокус ста-

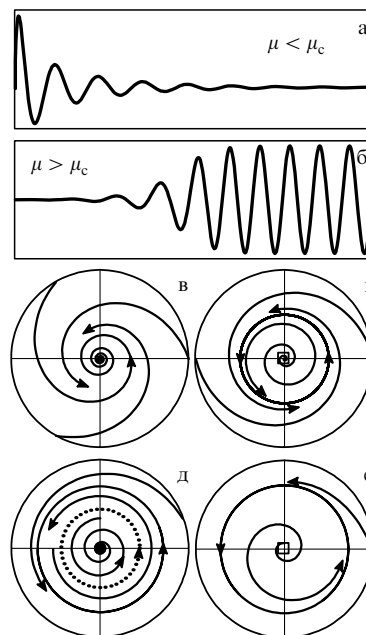


Рис. 18. (а) Экспоненциально затухающие осцилляции. (б) Возрастание амплитуды осцилляций. (в, г) Мягкое возбуждение осцилляций. (д, е) Жесткое возбуждение осцилляций.

новится неустойчивым, а единственным аттрактором при этом остаётся устойчивый предельный цикл больших размеров. В этом случае скачком возбуждаются колебания большой амплитуды.

Приложение 3. Усложнённая модель кальциевых осцилляций

В усложнённой модели кальциевых осцилляций, которая описывается в [40], предполагается, что клетка открыта по кальцию — в модели появляются два новых потока: J_{PMCA} и J_{in} . Поток J_{PMCA} обозначает поток кальция, направленный против градиента концентрации из цитозоля во внешнее пространство через внешнюю мембрану клетки. Этот поток обеспечивается насосами PMCA. Зависимость скорости работы PMCA от концентрации кальция похожа на зависимость для SERCA (рис. 5б):

$$J_{PMCA} = \frac{V_p c^2}{K_p^2 + c^2},$$

где $V_p = 2,8 \text{ мкМ}^{-1} \text{ с}^{-1}$, $K_p = 0,425 \text{ мкМ}$.

В поток J_{in} объединяются потоки кальция из внешнего пространства внутрь клетки через кальциевые каналы и утечка кальция: $J_{in} = J_{chan} + J_{leakP}$. Известно, что многие из кальциевых каналов открываются при увеличении концентрации IP3 и позволяют кальцию свободно втекать в клетку по градиенту концентрации. Обычно предполагают, что скорость потока кальция через эти каналы линейно зависит от концентрации IP3. Тогда вместе с утечкой, которая, как правило, постоянна,

$$J_{in} = q_1 + q_2 p,$$

где $q_1 = 0,003 \text{ мкМ с}^{-1}$, $q_2 = 0,02 \text{ с}^{-1}$.

Зависимость потока через SERCA, которая также изменяется, выражается как

$$J_{SERCA} = \frac{c - \gamma_1 c_e}{\gamma_2 - \gamma_3 c + \gamma_4 c_e + \gamma_5 c c_e},$$

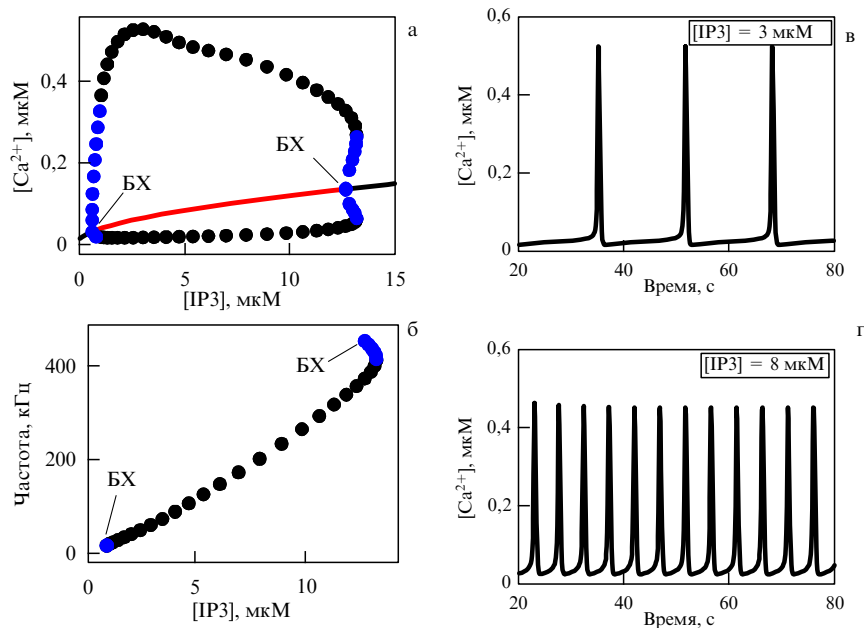


Рис. 19. (В цвете онлайн.) (а) Бифуркационная диаграмма модели. Сплошной чёрной кривой показано устойчивое положение равновесия системы. Красная кривая соответствует неустойчивому положению равновесия. Синими кружками показана амплитуда неустойчивых осцилляций концентрации кальция, чёрными кружками — амплитуда устойчивых её осцилляций. Вначале в системе возникает бифуркация Пуанкаре–Андропова–Хопфа и происходит жёсткое возбуждение осцилляций концентрации кальция. При увеличении концентрации IP3 происходит ещё одна бифуркация Пуанкаре–Андропова–Хопфа, неустойчивый предельный цикл разрастается и поглощает устойчивый, после чего осцилляции становятся затухающими. (б) Зависимость частоты осцилляций концентрации кальция от концентрации IP3. Примеры осцилляций концентрации кальция при концентрации IP3 3 мкМ (в) и 8 мкМ (г).

где $\gamma_1 = 10^{-4}$, $\gamma_2 = 0,007$ с, $\gamma_3 = 0,06$ мкМ $^{-1}$ с, $\gamma_4 = 0,0014$ мкМ $^{-1}$ с, $\gamma_5 = 0,007$ мкМ $^{-2}$ с.

Динамика рецептора IP3R также сильно изменяется. В усложнённых моделях учитывается, что этот рецептор может находиться в шести разных состояниях, между которыми могут происходить различные переходы. Эти состояния следующие: R — неактивный рецептор; O — рецептор открыт; S — рецептор закрыт высокой концентрацией кальция; A — рецептор активирован; I_1 и I_2 — рецептор инактивирован. Динамика переходов между этими состояниями описывается следующими уравнениями:

$$\begin{aligned}\frac{dR}{dt} &= \phi_{-2}O - \phi_2pR + k_{-1}I_1 - \phi_1R, \\ \frac{dO}{dt} &= \phi_2pR - (\phi_{-2} + \phi_4 + \phi_3)O + \phi_{-4}A + k_{-3}S, \\ \frac{dA}{dt} &= \phi_4O - \phi_{-4}A - \phi_5A + k_{-1}I_2, \\ \frac{dI_1}{dt} &= \phi_1R - k_{-1}I_1, \\ \frac{dI_2}{dt} &= \phi_5A - k_{-1}I_2,\end{aligned}$$

где

$$\begin{aligned}\phi_1 &= \frac{\alpha_1 c}{\beta_1 + c}, \quad \phi_2 = \frac{\alpha_2 + \beta_2 c}{\beta_1 + c}, \quad \phi_3 = \frac{\alpha_3}{\beta_3 + c}, \quad \phi_4 = \frac{\alpha_4 c}{\beta_3 + c}, \\ \phi_5 &= \frac{\alpha_5 c}{\beta_5 + c}, \quad \phi_{-2} = \frac{\alpha_{-2} + \beta_{-2} c}{\beta_3 + c}, \quad \phi_{-4} = \frac{\alpha_{-4}}{\beta_5 + c}, \\ R + O + S + A + I_1 + I_2 &= 1,\end{aligned}$$

$\alpha_1 = 0,3$ с $^{-1}$, $\alpha_2 = 0,77$ с $^{-1}$, $\alpha_{-2} = 76,6$ мкМ с $^{-1}$, $\alpha_3 = 6$ с $^{-1}$, $\alpha_4 = 4926$ с $^{-1}$, $\alpha_{-4} = 1,43$ с $^{-1}$, $\alpha_5 = 1,78$ с $^{-1}$, $\beta_1 = 0,02$ мкМ, $\beta_2 = 1,38$ мкМ $^{-1}$ с $^{-1}$, $\beta_{-2} = 137$ с $^{-1}$, $\beta_3 = 54,7$ мкМ, $\beta_5 = 0,12$ мкМ, $k_{-1} = 0,84$ с $^{-1}$, $k_{-3} = 29,8$ с $^{-1}$.

Динамика кальция описывается уравнениями:

$$\begin{aligned}\frac{dc}{dt} &= J_{IP3R} + J_{leak} - J_{SERCA} + J_{PMCA} - J_{in}, \\ \frac{dc_e}{dt} &= -\gamma(J_{IP3R} + J_{leak} - J_{SERCA}),\end{aligned}$$

где

$$J_{IP3R} = k_f(0,1O + 0,9A)^4(c_e - c), \quad J_{leak} = L_{er}(c_e - c),$$

$L_{er} = 0,002$ с $^{-1}$, $\gamma = 5,4$, $k_f = 0,96$ с $^{-1}$ — параметры модели.

На рисунке 19 показаны результаты расчёта по усложнённой модели. Базовые элементы осцилляций концентрации кальция не изменились. Активация происходит благодаря бифуркации Пуанкаре–Андропова–Хопфа, увеличение IP3 приводит к возрастанию частоты колебаний.

Список литературы

1. Alberts B et al. *Molecular Biology of the Cell* (New York: Garland Science, Taylor and Francis Group, 2015)
2. Clapham D E *Cell* **131** 1047 (2007)
3. Berridge M J, Bootman M D, Roderick H L *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **4** 517 (2003)
4. Bootman M D *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **4** a011171 (2012)
5. Berridge M J *J. Physiol.* **586** 5047 (2008)
6. Ross W N *Nature Rev. Neurosci.* **13** 157 (2012)

7. Volterra A, Liaudet N, Savtchouk I *Nature Rev. Neurosci.* **15** 327 (2014)
8. Whitaker M *Physiol. Rev.* **86** 25 (2006)
9. Vig M, Kinet J-P *Nature Immunology* **10** 21 (2009)
10. Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B *J. Thrombos. Haemostas.* **7** 1057 (2009)
11. Ringer S J. *Physiol.* **4** 29 (1883)
12. Shimomura O, Johnson F H, Saiga Y J. *Cell. Compar. Physiol.* **59** 223 (1962)
13. Ridgway E B, Gilkey J C, Jaffe L F *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** 623 (1977)
14. Tsien R Y *Biochemistry* **19** 2396 (1980)
15. Woods N M, Cuthbertson K S, Cobbold P H *Nature* **319** 600 (1986)
16. Berridge M J *Nature* **386** 759 (1997)
17. Michelson A D (Ed.) *Platelets* (London: Academic Press, 2013)
18. Heemskerk J W M, Mattheij N J A, Cosemans J M E M *J. Thrombos. Haemostas.* **11** 2 (2013)
19. Stalker T J et al. *Blood* **121** 1875 (2013)
20. Welsh J D et al. *Blood* **124** 1808 (2014)
21. Tomaiuolo M et al. *Blood* **124** 1816 (2014)
22. Stalker T J et al. *Blood* **124** 1824 (2014)
23. Welsh J D et al. *Blood* **127** 1598 (2016)
24. Agbani E O, Poole A W *Blood* **130** 2171 (2017)
25. Fogelson A L, Neeves K B *Annu. Rev. Fluid Mech.* **47** 377 (2015)
26. Rivera J et al. *Haematologica* **94** 700 (2009)
27. Li Z et al. *Arteriosclerosis Thrombos. Vascular Biol.* **30** 2341 (2010)
28. Kazmierczak J, Kempe S, Kremer B *Curr. Organic Chem.* **17** 1738 (2013)
29. Атауллаханов Ф И и др. *Биологические мембраны* **26** 163 (2009)
30. Dupont G *Models of Calcium Signalling* (New York: Springer Science, 2016)
31. Hohendanner F et al. *Front. Pharmacology* **5** 35 (2014)
32. Blackwell K T J. *Neurosci. Meth.* **220** 131 (2013)
33. Manninen T, Havela R, Linne M-L *Front. Comput. Neurosci.* **12** 14 (2018)
34. Dupont G et al. *Biochim. Biophys. Acta* **1498** 134 (2000)
35. Slaby O, Lebedez D *Biophys. J.* **96** 417 (2009)
36. Atri A et al. *Biophys. J.* **65** 1727 (1993)
37. Sveshnikova A N, Ataullakhanov F I, Pantelev M A *Mol. Biosyst.* **11** 1052 (2015)
38. Rink T J, Sage S O *Annu. Rev. Physiol.* **52** 431 (1990)
39. Sage S O et al. *J. Thrombos. Haemostas.* **9** 540 (2011)
40. Keener J, Sneyd J, in *Mathematical Physiology* Pt. 1 (Interdisciplinary Applied Mathematics, Vol. 8, Eds J Keener, J Sneyd) (New York: Springer, 2009) p. 273
41. Bezprozvanny I, Watras J, Ehrlich B E *Nature* **351** 751 (1991)
42. Lytton J et al. *J. Biol. Chem.* **267** 14483 (1992)
43. Donahue B S, Abercrombie R F *Cell Calcium* **8** 437 (1987)
44. Sneyd J et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101** 1392 (2004)
45. De Pittà M et al. *Phys. Rev. E* **77** 030903(R) (2008)
46. De Young G W, Keizer J *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** 9895 (1992)
47. Gillespie D T *Annu. Rev. Phys. Chem.* **58** 35 (2007)
48. Gelens L, Huang K C, Ferrell J E (Jr.) *Cell. Rep.* **12** 892 (2015)
49. Balabin F A, Sveshnikova A N *Math. Biosci.* **276** 67 (2016)
50. Murray J D *Mathematical Biology* (New York: Springer, 2002); Пер. с англ. яз.: Мюррей Д *Математическая биология* (М.–Ижевск: ПХД, 2009)
51. Oancea E, Meyer T *Cell* **95** 307 (1998)
52. Violin J D et al. *J. Cell Biol.* **161** 899 (2003)
53. Rosse C et al. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **11** 103 (2010)
54. Kupzig S, Walker S A, Cullen P J *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** 7577 (2005)
55. Cullen P J, Lockyer P J *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **3** 339 (2002)
56. Magnus G, Keizer J *Am. J. Physiol.* **273** C717 (1997)
57. Pokhilko A V, Ataullakhanov F I, Holmuhamedov E L J. *Theor. Biol.* **243** 152 (2006)
58. Shakhidzhanov S S et al. *Biochim. Biophys. Acta* **1850** 2518 (2015)
59. Obyedenny S I et al. *J. Thrombos. Haemostas.* **14** 1867 (2016)
60. Sveshnikova A N et al. *J. Thrombos. Haemostas.* **14** 2045 (2016)
61. Rudolf R et al. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **4** 579 (2003)

Calcium oscillations in blood platelets and their possible role in ‘interpreting’ extracellular information by cells

S.S. Shakhidzhanov^{(1,2,*), F.A. Balabin^{(1,†), S.I. Obyedenny^{(1,3), F.I. Ataullakhanov^{(1,2,3,‡), A.N. Sveshnikova^(1,2,3,4)}}}}

⁽¹⁾ Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, 119991 Moscow, Russian Federation

⁽²⁾ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Physics, Leninskie gory 1, str. 2, 119991 Moscow, Russian Federation

⁽³⁾ Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, ul. Samory Mashela 1, 117997 Moscow, Russian Federation

⁽⁴⁾ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, ul. Trubetskaya 8/2, 119991 Moscow, Russian Federation
E-mail: * shakhidzhanov.s@yandex.ru, † fa.balabin@physics.msu.ru, ‡ ataullakhanov.fazly@gmail.com

Intracellular Ca^{2+} ions play an important role in transmitting and interpreting information that cells obtain from ambient environment. Having received an external signal, the cell may increase the intracellular Ca^{2+} concentration within fractions of second by a factor of several hundreds. This phenomenon triggers activation of various cellular systems that generate a response to the external stimulus. The Ca^{2+} concentration increases in many cells under the effect of an external signal and, apart from it, starts oscillating. Both the frequency and amplitude of those oscillations are influenced by the external signal strength. There are reasons to hypothesize that the conversion of the external signal into the oscillating intracellular signal has some important informational meaning. Methods to measure dynamics of the intracellular Ca^{2+} concentration and mechanisms that generate those oscillations are reviewed, and the hypotheses how the cell decodes Ca^{2+} concentration oscillations are presented. The consideration is focused on the platelet, the cell that plays a key role in arrest of hemorrhage. If a vessel is damaged, the platelet is rapidly activated. Identical platelets are divided in the process of arresting hemorrhage into three populations with quite different missions. The platelet seems to somehow ‘interpret’ the set of external signals and uses the Ca^{2+} concentration oscillations to ‘choose’ the population to which it will belong. Owing to the platelet’s relative simplicity, there are hopes that the studies of that cell will shortly enable deciphering of the ‘code’ that drives the Ca^{2+} concentration oscillations.

Keywords: intracellular calcium concentration oscillations, platelets, coding, decoding, Poincaré–Andronov–Hopf bifurcation

PACS numbers: 87.10.Ed, **87.16.–b**, **87.19.–j**

Bibliography — 61 references

Received 8 May 2018

Uspekhi Fizicheskikh Nauk **189** (7) 703–719 (2019)

Physics–Uspekhi **62** (7) (2019)

DOI: <https://doi.org/10.3367/UFNr.2018.05.038335>

DOI: <https://doi.org/10.3367/UFNe.2018.05.038335>