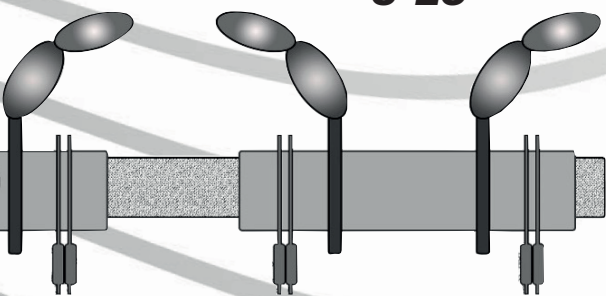




2025 №1

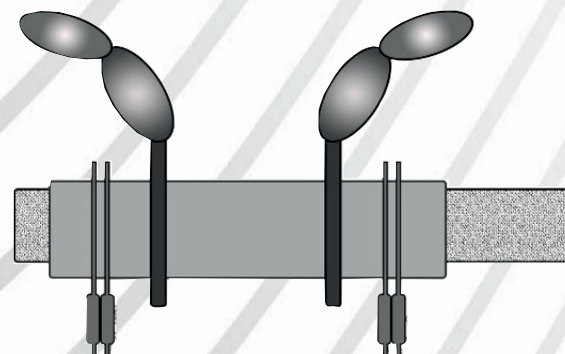
Определение роли перестройки цитоскелета в процессе кластеризации тромбоцитарных рецепторов к коллагену методами агентного моделирования
Болдова А.Е. и соавт.

3-15



Ультрарасчувствительность и пороги в киназных и протеазных каскадах
Кадыров Т.И.

22-29



Математическое моделирование в решении сложных биофизических задач

Коваленко Т.А.

35-37

Ограничения применения метода оценки старшего показателя Ляпунова для оценки сложности кальциевых осцилляций
Ведерников Л.С. и соавт.

16-21

Математические модели активации протеинкиназы С: текущий статус и перспективы
Емельянов Н.С.

30-34

Содержание

1. *А.Е. Болдова, Д.Ю. Нечипуренко, М.А. Пантелеев, А.Н. Свешникова* Определение роли перестройки цитоскелета в процессе кластеризации тромбоцитарных рецепторов к коллагену методами агентного моделирования.....3
2. *Л.С. Ведерников, С.В. Галкина, А.Н. Свешникова* Ограничения применения метода оценки старшего показателя Ляпунова для оценки сложности кальциевых осцилляций.....16
3. *Т.И. Кадыров* Ультрачувствительность и пороги в киназных и протеазных каскадах.....22
4. *Н.С. Емельянов* Математические модели активации протеинкиназы С: текущий статус и перспективы30
5. *Т.А. Коваленко* Математическое моделирование в решении сложных биофизических задач35

Определение роли перестройки цитоскелета в процессе кластеризации тромбоцитарных рецепторов к коллагену методами агентного моделирования

Determining the role of cytoskeletal reorganization in clustering of platelet receptors (GPVI) to collagen using agent-based modeling

А.Е. Болдова⁴, Д.Ю. Нечипуренко^{1,2,3}, М.А. Пантелеев^{1,2,3}, А.Н. Свешникова^{1,2,3#}.
A. E. Boldova⁴, D. Yu. Nechipurenko^{1,2,3}, M.A. Panteleev^{1,2,3}, A. N. Sveshnikova^{1,2,3#}.

1. Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Россия, 109029, г. Москва, ул. Средняя Калитниковская, д. 30
2. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Россия, 117997, г. Москва, ул. Саморы Машела, д. 1
3. Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия, 119991, г. Москва, Ленинские Горы, д. 1, корп. 2
4. ФГБУ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, 117513, Москва, ул. Островитянова, 1, стр. 10

Автор для переписки: a.sveshnikova@physics.msu.ru

1. Center for Theoretical Problems of Physico-chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, 30 Srednyaya Kalitnikovskaya st., Moscow, 109029, Russia
2. Dmitry Rogachev National Medical Research Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, 1 Samory Mashela st., Moscow, 117997, Russia
3. Lomonosov Moscow State University, 1/2 Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russia
4. The FBSI "Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies" of the Federal Medical and Biological Agency, 117513, Moscow, Ostrovityanova st., 1, 10

Получено: 28.04.2025

Принято к публикации: 29.10.2025

Опубликовано: 31.12.2025

EDN: KJFYAJ

DOI: 10.65189/2949-0758-2025-4-1-3-15

Аннотация

Передача внешнего стимула внутрь клетки обычно осуществляется за счет работы клеточных рецепторов. Можно выделить целый класс рецепторов, для которых одним из важнейших этапов передачи сигнала является кластеризация. В качестве основных индукторов кластеризации чаще всего рассматривают либо их связывание с общим лигандом, либо изменение аффинности друг к другу. Регуляция процесса кластеризации мембранных рецепторов происходит за счет целого ряда факторов, зависящих как от молекулы активатора (например, его структура и валентность), так и от микроокружения рецепторов в мембране клетки (вязкость и текучесть локального участка мембраны, определяемая липидным составом). Однако, недавно стало известно, что возможно существование еще одного фактора микроокружения, влияющего на процесс кластеризации, а именно: локальной перестройки цитоскелета клетки при активации рецепторов. Данный процесс приводит к увеличению подвижности молекул в ограниченной области, в результате чего возможно значительное

повышение вероятности столкновения с другими рецепторами и их последующей активации.

В настоящей работе была разработана компьютерная модель активации тромбоцитарных рецепторов GPVI от коллаген подобного пептида, учитывающая липидное микроокружение и способность активированного рецептора инициировать перестройку цитоскелета.

С помощью данной модели была проведена оценка роли локальной перестройки цитоскелета в покое и при активации. Было показано, что количество кластеризованных рецепторов как в состоянии покоя, так и при активации максимально в том случае, когда изменения цитоскелета (и скорости диффузии, соответственно) носят локальный характер. При постоянных значениях скорости диффузии (как минимально, так и максимально возможных), кластеризация наблюдается для меньшего числа рецепторов.

Таким образом, в данной работе было показано, что локальная перестройка цитоскелета играет одну из важных ролей в процессе кластеризации и активации целого класса мембранных рецепторов.

Работа поддержана грантом РФФИ 23-44-00082.

Ключевые слова: Агентное моделирование, Кластеризация, Рецепторы, кортикальный цитоскелет.

Annotation

The process of transmitting external stimuli into the cell is typically achieved through the activity of cellular receptors. A significant number of receptors are capable of clustering, which represents a crucial step in the transmission of signals. The clustering of receptors could be triggered by the binding of a common ligand or a change in receptor affinity. The regulation of membrane receptor clustering depends on multiple factors related both to the activating molecule (such as its structure and valency) and the local membrane environment around the receptors (e.g., the viscosity and fluidity of the membrane area, determined by its lipid composition). It has recently been demonstrated that an additional environmental factor may exert an influence on clustering, namely the local reorganization of the cell's cytoskeleton upon receptor activation. This process increases the mobility of molecules within a restricted area, thereby significantly raising the likelihood of receptor collisions and subsequent activation.

In this study, a computational model was developed to investigate the activation of platelet GPVI receptors by a collagen-like peptide, taking into account the lipid microenvironment and the ability of the receptor to induce cytoskeletal reorganization upon activation. The model was employed to evaluate the role of local cytoskeletal reorganization in both resting and activated states. The findings indicated that the greatest number of clustered receptors, both in resting and activated states, was observed when cytoskeletal alterations (and, consequently, diffusion rates) were localised. When the diffusion rates were maintained at a constant level, irrespective of whether they were at their minimum or maximum values, the clustering of receptors was observed to occur for a smaller number of receptors.

The findings of this study illustrate that local cytoskeletal reorganization plays an important role in the clustering and activation of platelet GPVI receptors.

The work was supported by the RSF 23-44-00082.

Key words: Agent-based modeling, Clustering, Receptors, Cortical cytoskeleton.

Введение

Одной из часто встречающихся задач математической биологии является

моделирование агрегации (кластеризации, полимеризации) белков и других биомолекул [1]. Классическим подходом для решения такой задачи является система уравнений Смолуховского, основанная на законе действующих масс. Данная система позволяет описать временную динамику концентрации агрегатов различного размера [2]. Формирование агрегатов определяется двумя основными процессами: слипанием агрегатов меньшего размера, а также распадом до более мелких агрегатов [2]. В общем виде данный процесс может быть описан в виде следующей реакции: $A_i + A_j \leftrightarrow A_{(i+j)}$ при $i, j \geq 1$, где символами $A_i, A_j, A_{(i+j)}$ обозначена концентрация агрегатов размера i, j и $i+j$ соответственно [1]. Данной системе реакций соответствует следующая система обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ):

$$\begin{cases} \frac{dA_i}{dt} = -k_{ij}A_iA_j + k_{i+j}A_{i+j} \\ \frac{dA_j}{dt} = -k_{ij}A_iA_j + k_{i+j}A_{i+j} \\ \frac{dA_{i+j}}{dt} = k_{ij}A_iA_j - k_{i+j}A_{i+j} \end{cases}$$

где k_{ij} – константа скорости «слипания» агрегатов размеров i и j , k_{i+j} – константа скорости разделения большого агрегата на два размера i и j .

Ограничением такого моделирования, помимо длительности расчетов, является отсутствие достоверной информации о распределении агрегатов по размеру в реальной биологической системе, из-за чего невозможно однозначно определить параметры модели по экспериментальным данным. Для решения первой проблемы ранее была предложена упрощенная схема Смолуховского, при которой сложная мультипараметрическая система уравнений сводится к системе, состоящей из двух ОДУ. Переменными в данном случае будут выступать концентрации отдельных частиц и кластеров, содержащих больше одной частицы. В основе данного подхода лежит предположение о различиях в скоростях ассоциации/диссоциации агрегатов между собой и между агрегатом и отдельной частицей [1]. Данная схема действительно позволяет существенно сократить времена вычислений и количество варьируемых параметров, однако в то же время она дает возможность получить только общую информацию о системе (например, средний размер агрегата и количество одиночных частиц) [1].

Однако для моделирования начальных этапов кластеризации рецепторов описанный выше метод неприменим. В клеточной биологии процессы олигомеризации рецепторов являются ключевыми для множества задач [3]. Особое значение имеет кластеризация рецепторов,

ассоциированных с тирозинкиназами – ферментами, которые катализируют фосфорилирование, то есть присоединение фосфатной группы к аминокислотным остаткам тирозина в белках-мишенях [4]. За счет данной модификации значительным образом могут измениться функциональные особенности белков. Она играет огромное значение поскольку управляет активацией, например, иммунных клеток – лимфоцитов [5,6] и нейтрофилов [7,8]. В тромбоцитах – клетках, отвечающих за мониторинг целостности сосудистого русла – одним из таких рецепторов является гликопротеин VI (GPVI) [9,10]. Данный рецептор принадлежит к классу трансмембранных белков, пронизывающих клеточную мембрану. Внеклеточная часть рецептора содержит довольно крупные участки – домены, благодаря которым рецептор может определять наличие активатора во внешнем пространстве. В процессе кластеризации запускается каскад реакций фосфорилирования и образования большого белкового комплекса, называемого сигнасомой. В результате тромбоцит может перейти в активированное состояние: происходит изменение формы, секреция гранул, изменение активности поверхностных белков [10,11].

Одним из основных лигандов GPVI является коллаген [12]. Связывание рецептора с коллагеном обусловлено наличием в последнем повторяющейся аминокислотной последовательности глицин-пролин-гидроксипролин (GPO) [13]. Интересно, что аффинность мономеров и димеров GPVI к коллагену может различаться более чем в 100 раз [12,14,15]. В процессе активации количество димеров GPVI возрастает [14], в результате чего тромбоцит способен связывать больше молекул коллагена. За счет данного механизма возможна реализация положительной обратной связи [12]. Помимо коллагена существует ряд других лигандов GPVI – как естественного происхождения (фибрин [16–19], ламинин [20], адипонектин [21], конвульксин [22,23]), так и синтетических (например, коллаген-подобный пептид – CRP [13,24]), – которые индуцируют кластеризацию и активацию GPVI.

Существенным фактором, влияющим на кластеризацию белков в распределенных системах, является скорость их диффузии [3,25]. Для трансмембранных рецепторов данный параметр определяется свойствами локального микроокружения [26]. Многие рецепторы, ассоциированные с тирозинкиназами (например, рецептор семейства лектиноподобных типа C-LEC-2, рецептор В-клеток – BCR, рецептор Т-клеток – TCR) располагаются в так называемых липидных рафтах. Липидные рафты представляют собой

ограниченные области мембраны, обогащенные липидами определённого состава, такими как холестерин и насыщенные глицерофосфолипиды [27–32]. Благодаря присутствию в составе рафта холестерина средняя площадь, приходящаяся на отдельную молекулу липида, уменьшается [33,34]. Таким образом, обеспечивается более высокая плотность упаковки молекул липидов в пределах одного рафта [33,34]. Соответственно, при попадании в липидный рафт способность белков к диффузии может значительно снижаться, что способствует стабилизации образованных белковых кластеров. Рецепторы GPVI также принадлежат классу рецепторов, ассоциированных с тирозинкиназами, и располагаются преимущественно в области липидных рафтов [27,35–37].

Еще одним фактором, влияющим на диффузию белков в мембране, является примембранный цитоскелет (кортекс) – сеть актиновых филаментов, формирующая структурный каркас под плазматической мембраной [38]. Толщина кортикального цитоскелета составляет от 50 нм до 400 нм [39,40], а размер ячеек, образуемых актиновыми нитями, составляет 20–200 нм [40]. Филаменты служат «барьерами», препятствующими движению трансмембранных белков [41,42]. При активации клетки запускаются процессы полимеризации и деполимеризации актина, что приводит к изменению размера ячеек сети [43]. Частным случаем такой реорганизации является локальная перестройка цитоскелета, индуцированная связыванием лиганда с тирозинкиназным рецептором [44–46]. Можно предположить, что активация отдельного рецептора вызывает локальную перестройку цитоскелета, приводящую к локальному ускорению диффузии, и тем самым способствует кластеризации соседних рецепторов. В результате можно ожидать усиление активации клетки и дальнейшую перестройку цитоскелета. Однако, экспериментальная проверка данной гипотезы является крайне сложной задачей. В настоящей работе мы применяем метод агентного моделирования, которое позволяет воспроизвести диффузию и кластеризацию рецепторов (на примере GPVI) в сочетании с динамической реорганизацией примембранного кортекса в ответ на активацию клетки.

Материалы и Методы

В данной работе представлена пространственная компьютерная модель динамики диффузии, кластеризации и фосфорилирования GPVI, созданная с использованием метода агентного моделирования (AM). AM представляет собой

один из методов имитационного моделирования [47]. В основе АМ лежит предположение о том, что система моделируется как совокупность автономных объектов, называемых агентами [48,49]. Каждому агенту присваивается набор характеристик и правил, определяющих как его внутреннее состояние, так и взаимодействие с другими агентами и окружающей средой [47].

Для моделирования был выбран регион плазматической мембраны тромбоцита размером 0.6×0.6 мкм² (что составляет приблизительно 2 % от общей поверхности покоящегося тромбоцита). Моделируемый участок состоял из 2 несмешивающихся частей: липидных рафтов и окружающую их мембрану. В роли агентов были выбраны липидные рафты и отдельные рецепторы GPVI. Липидные рафты были представлены в виде круглых областей, чьи радиусы лежат в диапазоне от 4 до 100 нм [50]. В качестве основных параметров для липидных рафтов задавались координаты центров и радиусы. В случае сближения двух рафтов на расстояние, меньшее суммы их радиусов, происходило их слияние в единый рафт. В данном случае образовавшийся рафт инициализировался как новый объект, координаты центра и радиус которого рассчитывались по формулам:

$$\begin{pmatrix} x_0 \\ y_0 \end{pmatrix} = \frac{R_1^2}{R_1^2 + R_2^2} \begin{pmatrix} x_1 \\ y_1 \end{pmatrix} + \frac{R_2^2}{R_1^2 + R_2^2} \begin{pmatrix} x_2 \\ y_2 \end{pmatrix}, \quad (1)$$

$$R = \sqrt{R_1^2 + R_2^2} \quad (2)$$

где (x_0, y_0) , (x_1, y_1) и (x_2, y_2) - координаты центров объединенного и двух исходных рафтов; R , R_1 и R_2 - радиусы объединенного и двух исходных рафтов.

В качестве основных параметров для отдельных рецепторов задавались координаты центров, радиусы и состояние (активированное или неактивированное). В рамках модели было принято допущение, что молекулы GPVI могут находиться исключительно в липидных рафтах. Каждый рецептор моделировался как жесткий (недеформируемый) круглый объект радиусом 25 нм [13] и мог находиться в одном из двух состояний: неактивированном (дефосфорилированном) и активированном (фосфорилированном) (рис.1). Если расстояние между двумя рецепторами не превышало удвоенного радиуса, считалось, что они образуют кластер. Кластеризация могла происходить как в результате случайных столкновений рецепторов в мембране, так и за счет механического стягивания, осуществляемого молекулами активатора с фиксированным расстоянием между сайтами связывания. Находясь в кластере, неактивированный GPVI мог перейти в активированное состояние с

вероятностью P_{act} . Данный параметр определялся несколькими факторами: концентрацией активирующих Src-киназ в заданной области [51], а также их константой диссоциации с рецептором [3]. Поскольку Src-киназы располагаются преимущественно в области липидных рафтов [36], в модели предполагалось, что их количество пропорционально площади отдельного рафта. Таким образом, вероятность активации i -го рецептора описывалась следующим уравнением:

$$P_{act}[i] = P_0 * \frac{\pi * R_i^2}{S_{Lo}}, \quad (3)$$

где P_0 - вероятность активации кластеризованного рецептора, R_i - радиус липидного рафта, в котором находился i -рецептор, S_{Lo} - площадь липидных рафтов. Площадь липидных рафтов составляла 35 % [52,53] от площади мембраны и для моделируемого участка равна 0.126 мкм². Предполагается, что деактивация рецептора может происходить случайным образом с вероятностью P_{deact} .

В начальный момент времени все липидные рафты можно было разделить на 2 категории: свободные липидные рафты, не содержавшие рецепторов, а также связанные рафты, принадлежавшие отдельным рецепторам. Радиусы связанных липидных рафтов равны 25 нм. Количество свободных липидных рафтов вычислялось по следующей формуле:

$$N_{free} = \left[\frac{S_{Lo} - GPVI_0 * \pi * R_{bound}^2}{\pi * \left(\frac{R_{min} + R_{max}}{2} \right)^2} \right], \quad (4)$$

где S_{Lo} - площадь, занимаемая липидными рафтами, $GPVI_0$ - количество рецепторов GPVI на моделируемом участке мембраны, R_{bound} - радиус связанного липидного рафта в начальный момент времени, R_{min} , R_{max} - минимальный и максимальный радиусы свободных липидных рафтов в начальный момент времени соответственно.

В начальный момент времени координаты рецепторов GPVI задавались случайным образом. Связанные липидные рафты позиционировались так, чтобы их центры совпадали с координатами соответствующих рецепторов. Координаты центров остальных липидных рафтов распределяются в свободном пространстве. Радиусы свободных липидных рафтов выбирались также случайно в соответствии с нормальным распределением и лежали в диапазоне от 4 нм до 100 нм. При инициализации модели происходило объединение перекрывающихся липидных рафтов с образованием единого рафта. Центр и радиус образованного рафта вычислялись по формулам (1-2).

В основе модели лежало предположение о

том, что движение объектов (отдельных молекул GPVI и липидных рафтов) можно рассматривать как броуновское и, следовательно, описывать с помощью формулы Эйнштейна-Смолуховского. Таким образом, смещение r центра отдельной частицы в двумерном пространстве описывалось следующим уравнением:

$$r = \sqrt{4D\Delta t}, \quad (5)$$

где D – коэффициент диффузии объекта (рафтов или отдельных рецепторов GPVI), Δt – шаг времени.

Положение элементов модели вычислялось итеративно на основе их координат на предыдущем временном шаге. Координаты центра каждого рецептора GPVI определялись относительно центра липидного рафта, в котором тот был локализован.

Для обеспечения строгой локализации рецепторов в пределах своих мембранных доменов были заданы граничные условия. Если в результате расчёта новое положение молекулы GPVI оказывалось за пределами её рафта (т.е. расстояние от центра рецептора до центра рафта превышало его радиус), то направление её смещения изменялось на противоположное. При этом величина смещения сохранялась, что физически соответствует упругому отражению от границы домена.

В рамках модели предполагалось, что коэффициент диффузии рецепторов определялся относительной плотностью цитоскелета в месте их расположения. Коэффициент диффузии липидного рафта был обратно пропорционален натуральному логарифму его радиуса и также зависел от плотности актинового цитоскелета [41,54].

В построенной модели актиновый цитоскелет был задан неявным образом как фактор μ , влияющий на коэффициент диффузии

$$\mu(x, y, t) = \min \left(\mu_{max}, \mu_0 + \sum_i \frac{\nu \Delta t}{\sqrt{4\pi \delta \tau_i}} * e^{-\frac{(x-x_i)^2 + (y-y_i)^2}{4\delta \tau_i}} \right), \quad (6)$$

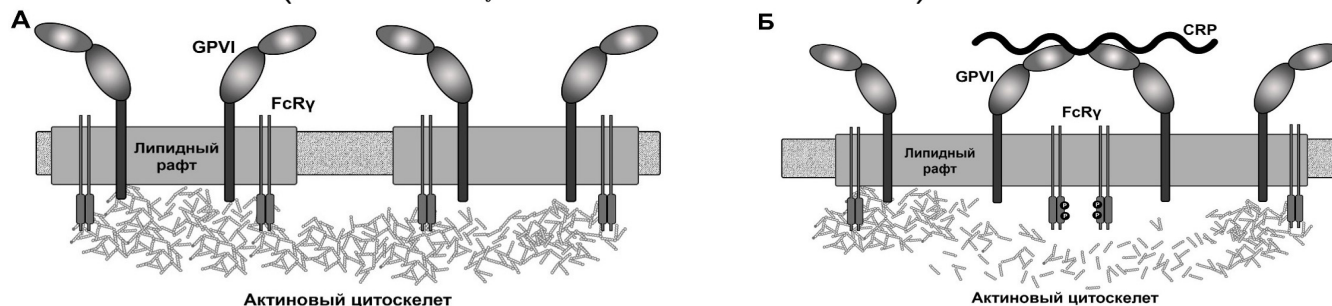


Рисунок 1. Схема модели состояния мембраны тромбоцита в покое (А) и при активации (Б). В покое диффузия отдельных рецепторов GPVI ограничена плотной сетью актинового цитооскелета. Молекула активатора (в данном случае, CRP) индуцирует физическое стягивание отдельных рецепторов друг к другу. При кластеризации GPVI может перейти в активированное состояние (то есть происходит фосфорилирование ITAM-мотивов, сопряженных с FcRγ-цепями рецепторов). Активация рецептора запускает цепь событий, в результате которых происходит изменение микроокружения (в том числе, изменяется липидный состав мембраны, окружающей рецептор). Данный процесс инициирует локальную деполимеризацию актинового цитоскелета, что вызывает увеличение коэффициента диффузии GPVI.

Обозначение	Параметр	Значение	Источник
Δt	Шаг времени	0.005 с	Данная работа
S_{tot}	Площадь полной поверхности мембраны тромбоцита	18 мкм ²	Оценено на основе [56]
θ	Доля моделируемого участка мембраны	0.02	Данная работа
θ_{lo}	Доля, занимаемая липидными рафтами, от общей площади мембраны	0.35	Оценено на основе [52,53]
S_0	Площадь моделируемого участка мембраны	0.36 мкм ²	Оценено на основе [56]
S_{Lo}	Площадь, занимаемая липидными рафтами моделируемого участка мембраны	0.126 мкм ²	Оценено на основе [52,53,56]
R_{min}	Минимальный радиус свободного липидного рафта в начальный момент времени	4 нм	Оценено на основе [50]
R_{max}	Максимальный радиус свободного липидного рафта в начальный момент времени	100 нм	Оценено на основе [50]
R_{bound}	Радиус связанного липидного рафта в начальный момент времени	25 нм	Оценено на основе [13]
$GPVI_{tot}$	Среднее количество рецепторов GPVI, приходящееся на 1 тромбоцит	9600	Оценено на основе [51]
$GPVI_0$	Количество рецепторов GPVI на моделируемом участке мембраны	192	Оценено на основе [51,56]
P_0	Вероятность активации кластеризованного рецептора	0.5	Данная работа
P_{deact}	Вероятность деактивации рецептора	0.5	Данная работа
μ_0	Степень «таяния» цитоскелета в области не активированных одиночных рецепторов	0.001	Данная работа
μ_{max}	Максимальная степень «таяния» цитоскелета	1	Данная работа
ν	Эффективность «таяния» цитоскелета	0.05 мкм/с	Данная работа
r_{GPVI}	Радиус рецептора GPVI	25 нм	Оценено на основе [13]
δ	Скорость распространения сигнала «таяния» цитоскелета	0.05 мкм ² /с	Данная работа
τ_d	Время деактивации источника «таяния» цитоскелета	0.35 с	Данная работа
D_{lo}	Коэффициент диффузии липидного рафта радиусом 25 нм	0.02 мкм ² /с	
D_{BCR}	Коэффициент диффузии молекулы GPVI	0.021 мкм ² /с	Оценено на основе [57]

Таблица 1. Параметры модели.

Результаты

Сопоставление результатов работы модели и существующих экспериментальных данных.

В рамках данной модели предполагалось, что активирующие молекулы не влияют на вероятность активации рецепторов напрямую, но способствуют их кластеризации. Соответственно, ключевыми параметрами активатора, регулирующими результат работы модели, являлись: концентрация, валентность (максимальное число связывающих рецепторов), а также наименьшее расстояние между ближайшими сайтами связывания.

Действие активатора в модели было задано следующим образом: при инициализации часть рецепторов GPVI случайным образом оказывалась жестко связанной внутри единого липидного

рафта, причем расстояние между центрами рецепторов соответствовало расстоянию между сайтами связывания активатора. После запуска модели, эти рецепторы могли свободно диффундировать и вращаться с коэффициентом диффузии, обратно пропорциональным размеру кластера.

В качестве активатора GPVI был рассмотрен CRP. Данный пептид способен связывать вместе до 5 рецепторов, причем расстояние между двумя ближайшими сайтами не превышало удвоенного радиуса отдельного рецептора GPVI [13]. Таким образом, благодаря 1 молекуле CRP 5 рецепторов могли быть объединены в единый кластер. В модели принималось, что связывание рецепторов и молекулы CRP являлось необратимым.

Состояния мембраны в различных условиях представлены на рис. 2А, Б. В результате

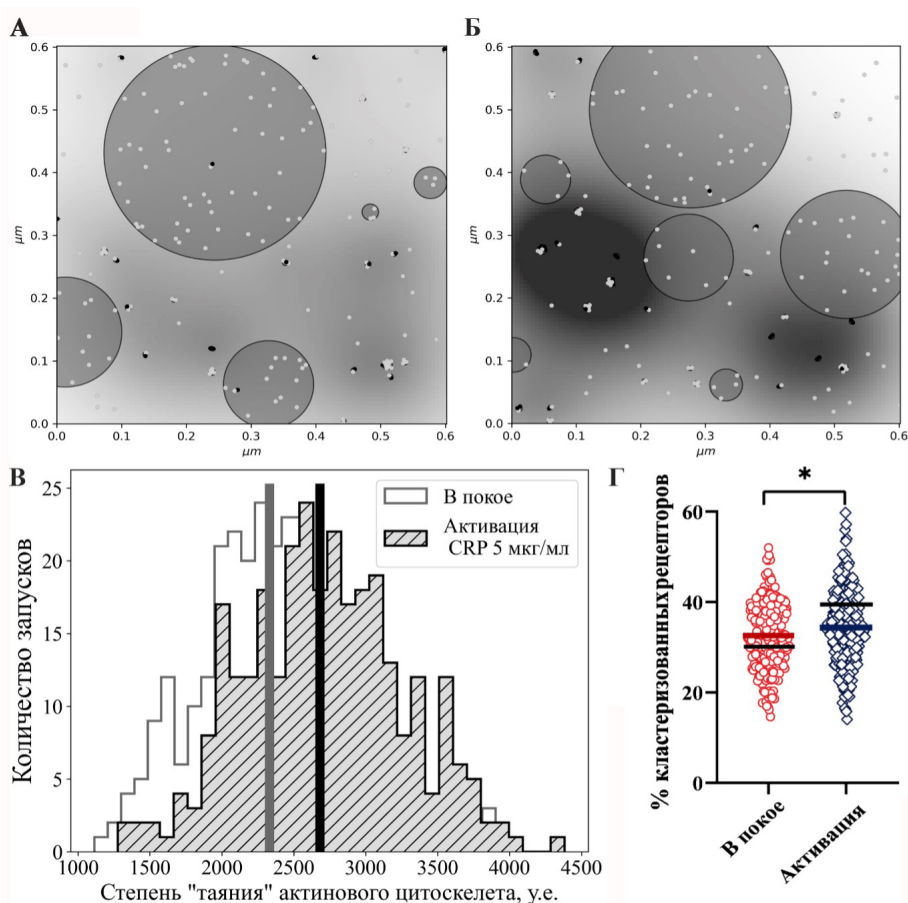


Рисунок 2. Результат работы модели в условиях покоя и активации. Типичное состояние мембраны в покое (А) и в результате активации 5 мкг/мл CRP (Б). Рецепторы в неактивированном состоянии обозначены светло-серыми точками, активированном – черными. Липидные рафты представлены в виде серых круглых областей с выделенной границей. Области с высоким значением коэффициента μ (и низкой плотностью цитоскелета, соответственно), представлены в виде темных участков на мембране. Области, где коэффициент μ минимален (а плотность цитоскелета максимальна) представлены белым цветом. Чем больше коэффициент μ в определенной точке, тем темнее данная точка. (В) Распределение степени «таяния» актинового цитоскелета на моделируемом участке мембраны на 100 с после запуска для покоевого состояния (обозначено серым контуром) и при активации 5 мкг/мл CRP (обозначено серым цветом с черными штриховыми линиями). Общее количество запусков для каждого из моделируемых условий – 240. Вертикальные серая и черная линии обозначают средние значения степени «таяния» в состоянии покоя и при активации соответственно. (Г) Сравнение предсказаний модели и экспериментальных данных [55] доли кластеризованных рецепторов в покое (результат отдельного запуска представлен красным кольцом, среднее значение по всем запускам обозначено красной горизонтальной чертой) и при активации 5 мкг/мл CRP (результат отдельного запуска представлен синим ромбом, среднее значение по всем запускам обозначено синей горизонтальной чертой) через 100 с после запуска. Экспериментальные данные представлены черными горизонтальными чертами для разных экспериментальных условий. Общее количество запусков для каждого из моделируемых условий – 240. Оценка статистической значимости производилась по t-критерию Стьюдента (* соответствуют p -value < 0.05).

расчетов было показано, что при активации 5 мкг/мл CRP доля кластеризованных рецепторов была статистически значимо ($p < 0.05$) выше, чем в стационарном состоянии (рис. 2Г). Кроме того, была произведена оценка степени «таяния» цитоскелета (представляющая собой интегральное значение коэффициента μ) при различных условиях (рис. 2В). Как можно видеть из гистограмм распределения (рис. 2В), степень «таяния» при активации была значительно выше, чем в покое.

Оценка влияния цитоскелета.

Для определения роли цитоскелета в поддержании состояния покоя и инициации активации были рассмотрены следующие ситуации: (1) степень «таяния» цитоскелета регулировалась сигналом от активированного рецептора; (2) актиновый цитоскелет не препятствовал движению, что соответствовало максимальному коэффициенту диффузии в каждой точке мембраны (в данном случае степень «таяния» принимала наибольшее значение μ_{\max}); (3) динамика актинового цитоскелета не зависела от активации отдельных рецепторов, что соответствовало минимальному значению коэффициента диффузии в каждой точке мембраны (степень «таяния» цитоскелета принимала наименьшее значение, равное μ_0). Результаты вычислений представлены на рис.3.

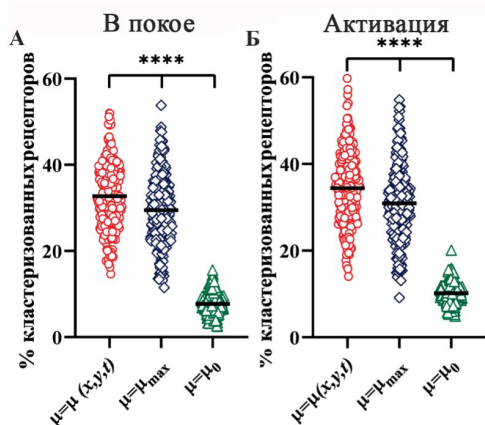


Рисунок 3. Оценка роли «таяния» цитоскелета для поддержания состояния покоя и в процессе активации 5 мкг/мл CRP. Доля кластеризованных рецепторов в состоянии покоя (А) и при активации (Б) при следующих условиях: коэффициент μ зависит от координаты, времени и описывается формулой (4) (результат отдельного запуска представлен красным кольцом); влияние цитоскелета на диффузию отдельных рецепторов минимально - коэффициент μ достигает максимального значения $\mu = \mu_{\max}$ (результат отдельного запуска представлен синим ромбом); «таяние» цитоскелета отсутствует - коэффициент μ не превышает минимального значения $\mu = \mu_0$ (результат отдельного запуска представлен зеленым треугольником). Общее количество запусков для каждого из моделируемых условий – 240. Результат рассматривался на 100 с после запуска модели. Оценка статистической значимости производилась по критерию Краскела-Уоллиса (**** соответствуют p -value < 0.0001).

Было установлено, что при максимальной степени «таяния» ($\mu = \mu_{\max}$) доля кластеризованных рецепторов (обозначены синими ромбами) была статистически значимо меньше как в состоянии покоя, так и при активации 5 мкг/мл CRP по сравнению со случаем, когда μ мог изменяться в зависимости от активации и кластеризации (обозначены красными кругами). Для минимальной степени «таяния» ($\mu = \mu_0$), как и ожидалось, доля кластеризованных рецепторов (обозначены зелеными треугольниками) была также существенно ниже, чем в случае изменяющейся μ .

Обсуждение и заключение

В настоящей работе была впервые разработана агентная компьютерная модель кластеризации рецепторов GPVI тромбоцита, учитывающая динамику цитоскелета в процессе активации. Данная модель позволяет оценить не только распределение кластеров рецепторов GPVI в различные моменты времени после активации, но и исследовать влияние перестроек цитоскелета на процессы активации и олигомеризации. За основу модели была принята одна из гипотез, предложенная для описания кластеризации и активации другого рецептора, запускающего тирозинкиназную сигнализацию, - рецептора В-клеток (BCR) [43,58,59]. Согласно литературным данным в покоящихся В-клетках диффузия BCR ограничена актиновым цитоскелетом, причем скорость диффузии обратно пропорциональна плотности актинового цитоскелета, расположенного под мембраной [58,60].

В первую очередь, с помощью построенной модели была оценена доля кластеризованных рецепторов. Особый интерес представляют результаты, полученные для состояния покоя. С помощью модели было показано, что более 30% рецепторов GPVI находятся в кластерах даже при отсутствии активатора. Этот результат согласуется с известным экспериментальным данным для GPVI [55]. Явление кластеризации рецепторов, ассоциированных с тирозинкиназами, при отсутствии активации характерно не только для тромбоцитов. Ярким примером служит BCR. С помощью высоко чувствительных методов было показано, что в состоянии покоя на поверхности В-клеток доля мономеров не превышает 60% от общего количества рецепторов [61]. Добавление активаторов (например, CRP к тромбоцитам или поливалентных фрагментов антител против BCR к В-клеткам) вызывало значительное увеличение доли димеров и олигомеров соответствующих рецепторов на поверхности клеток [55,61]. Эти экспериментальные наблюдения были успешно подтверждены с помощью разработанной

модели.

Построенная модель позволяет проверить гипотезу о роли цитоскелета на начальных этапах активации тромбоцита через рецептор GPVI. С помощью модели было показано, что доля кластеризованных рецепторов при постоянной плотности цитоскелета значительно ниже, чем при возможной локальной деполимеризации. Более того, было обнаружено, что при полной деполимеризации цитоскелета (степень «таяния» принимает максимальное значение во всех точках мембраны) доля кластеризованных рецепторов статистически значимо снижается по сравнению с ситуацией, когда степень «таяния» зависит от активации. На первый взгляд, данный результат может показаться неочевидным. При максимальной деполимеризации актинового цитоскелета коэффициент диффузии принимает наибольшее значение, что позволяет отдельным рецепторам двигаться быстрее и чаще сталкиваться. Однако отсутствие ограничений также приводит к увеличению расстояния, на которое рецепторы могут удаляться друг от друга между столкновениями. В случае локального изменения степени «таяния» цитоскелета (и, соответственно, коэффициента диффузии), рецепторы способны двигаться быстро и часто сталкиваться только в небольшой ограниченной области. Это предотвращает их значительное рассеивание. Доказательством нашего вывода могут служить работы [15,62], где экспериментально было показано, что добавление ингибиторов полимеризации актина приводит к снижению количества димеризованных рецепторов.

К настоящему времени опубликован ряд работ, посвященных активации и кластеризации рецепторов GPVI [1,56,63–67]. Большинство из них [1,64–67] основаны на решении системы ОДУ. Такие модели позволяют исследовать общий ответ клетки на действие активаторов и проанализировать отдельные этапы внутриклеточной сигнализации. Однако с их помощью невозможно получить данные о пространственном распределении рецепторов на поверхности мембраны или оценить влияние процессов, имеющих локальный характер. Альтернативным подходом является агентное моделирование. Данный метод был применен в работах [56,63] для исследования димеризации тромбоцитарных рецепторов, ассоциированных с тирозин киназами (а именно, CLEC-2 и GPVI). Авторы исследовали влияние таких параметров, как относительный коэффициент диффузии внутри и вне рафтов, размер рафтов, содержание дополнительных белков в компартментах. В отличие от нашей работы, в указанных исследованиях влияние

цитоскелета не рассматривалось. Процесс активации моделировался путем изменения константы ассоциации мономеров, что не позволяет непосредственно оценить, как различные дозы активатора и его валентность влияют на процесс кластеризации. Тем не менее, выводы нашей работы частично согласуются с результатами работы [56], где показано, что доля кластеризованных рецепторов возрастает, если рецепторы способны свободно двигаться только в ограниченной области.

Большинство существующих работ, посвященных моделированию взаимодействия цитоскелета и мембраны, в первую очередь направлены на то, чтобы предсказать изменения физических свойств мембраны в целом. Подобные модели позволяют рассчитать поверхностное натяжение мембраны, создаваемое примембранным кортексом [68], скорость роста фило- и ламеллоподий [69–72]. Отдельно следует отметить работы [73,74], в которых описаны экспериментальные данные о распределении липидов и формировании липидных рафтов при наличии статичного кортекса под мембраной. Однако, в данных работах не рассматриваются движение и кластеризация мембранных белков.

Построенная нами модель обладает рядом ограничений. Во-первых, в данной модели не реализован механизм разделения больших липидных рафтов на малые при достижении ими критического размера. Во-вторых, модель основана на допущении о том, что рецепторы GPVI могут находиться исключительно в липидных рафтах. В-третьих, в данной работе был рассмотрен упрощенный механизм активации рецепторов GPVI, зависящий только от заякоренных в мембране белков, но не учитывающий работу цитозольных ферментов, локализующихся на мембране в процессе активации.

В результате работы нами была разработана агентная компьютерная модель, позволившая определить роль локальной перестройки примембранного цитоскелета в процессе кластеризации и активации целого класса мембранных рецепторов.

Финансирование

Данная работа поддержана грантом Российского научного фонда 23-44-00082

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Список используемых сокращений

GPVI – гликопротеин 6 (glycoprotein VI)
CRP – коллаген-подобный пептид (collagen-related peptide)
CLEC-2 - рецептор семейства лектиноподобных типа C (C-type lectin-like)
BCR – В-клеточный рецептор (B-cell receptor)
CH – гомологичный кальпонину (calponin homology)
PIPs – полифосфоинозитиды (polyphosphoinositides)

Список литературы

1. Garzon Dasgupta AK, Martyanov AA, Filkova AA, Pantelev MA, Sveshnikova AN. De-velopment of a Simple Kinetic Mathematical Model of Aggregation of Particles or Clustering of Receptors. *Life* 2020;10:97. <https://doi.org/10.3390/life10060097>.
2. Лешаков О.Э., Логинов В.М. Коагуляция частиц в стохастической среде. *Сибирский журнал индустриальной математики* 2000:159–71.
3. Martyanov AA, Balabin FA, Dunster JL, Pantelev MA, Gibbins JM, Sveshnikova AN. Control of Platelet CLEC-2-Mediated Activation by Receptor Clustering and Tyrosine Kinase Signaling. *Biophys J* 2020;118:2641–55. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.04.023>.
4. Lee MJ, Yaffe MB. Protein Regulation in Signal Transduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016;8:a005918. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005918>.
5. Ketchum C, Miller H, Song W, Upadhyaya A. Ligand Mobility Regulates B Cell Receptor Clustering and Signaling Activation. *Biophysical Journal* 2014;106:26–36. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.10.043>.
6. Veneziano R, Moyer TJ, Stone MB, Wamhoff E-C, Read BJ, Mukherjee S, et al. Role of nanoscale antigen organization on B-cell activation probed using DNA origami. *Nat Nanotechnol* 2020;15:716–23. <https://doi.org/10.1038/s41565-020-0719-0>.
7. Bouti P, Webbers SDS, Fagerholm SC, Alon R, Moser M, Matlung HL, et al. β 2 Integrin Signaling Cascade in Neutrophils: More Than a Single Function. *Front Immunol* 2020;11:619925. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.619925>.
8. Langereis JD. Neutrophil integrin affinity regulation in adhesion, migration, and bacterial clearance. *Cell Adh Migr* 2013;7:476–81. <https://doi.org/10.4161/cam.27293>.
9. Свешникова АН., Степанян МГ, Пантелеев МА. Функциональные ответы тромбоцитов и внутриклеточная сигнализация: молекулярные связи. Часть 1: ответы n.d. <https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202101014>.
10. Степанян МГ, Филькова АА, Гарсон Дасгупта АК, Мартьянов АА, Свешникова АН. Активация тромбоцитов через рецептор GPVI: варибельность ответа. *Биол мембраны*

2020;37:442–52. <https://doi.org/10.31857/S0233475520060079>.

11. Ollivier V, Syvannarath V, Gros A, Butt A, Loyau S, Jandrot-Perrus M, et al. Collagen can selectively trigger a platelet secretory phenotype via glycoprotein VI. *PLoS One* 2014;9:e104712. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104712>.
12. Clark JC, Neagoe RAI, Zuidschewoude M, Kavanagh DM, Slater A, Martin EM, et al. Evidence that GPVI is Expressed as a Mixture of Monomers and Dimers, and that the D2 Do-main is not Essential for GPVI Activation. *Thromb Haemost* 2021;121:1435–47. <https://doi.org/10.1055/a-1401-5014>.
13. Feitsma LJ, Brondijk HC, Jarvis GE, Hagemans D, Bihan D, Jerah N, et al. Structural in-sights into collagen binding by platelet receptor glycoprotein VI. *Blood* 2022;139:3087–98. <https://doi.org/10.1182/blood.2021013614>.
14. Jung SM, Tsuji K, Moroi M. Glycoprotein (GP) VI dimer as a major collagen-binding site of native platelets: direct evidence obtained with dimeric GPVI-specific Fabs. *J Thromb Haemost* 2009;7:1347–55. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03496.x>.
15. Poulter NS, Pollitt AY, Owen DM, Gardiner EE, Andrews RK, Shimizu H, et al. Clustering of glycoprotein VI (GPVI) dimers upon adhesion to collagen as a mechanism to regulate GPVI signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 2017;15:549–64. <https://doi.org/10.1111/jth.13613>.
16. Alshehri OM, Hughes CE, Montague S, Watson SK, Frampton J, Bender M, et al. Fibrin activates GPVI in human and mouse platelets. *Blood* 2015;126:1601–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-04-641654>.
17. Mangin PH, Gardiner EE, Ariens RAS, Jandrot-Perrus M. Glycoprotein VI interplay with fibrin(ogen) in thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2023;21:1703–13. <https://doi.org/10.1016/j.jtha.2023.03.022>.
18. Mammadova-Bach E, Ollivier V, Loyau S, Schaff M, Dumont B, Favier R, et al. Platelet glycoprotein VI binds to polymerized fibrin and promotes thrombin generation. *Blood* 2015;126:683–91. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-629717>.
19. Mangin PH, Onselaer M-B, Receveur N, Le Lay N, Hardy AT, Wilson C, et al. Immobilized fibrinogen activates human platelets through glycoprotein VI. *Haematologica* 2018;103:898–907. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.182972>.
20. Inoue O, Suzuki-Inoue K, McCarty OJT, Moroi M, Ruggeri ZM, Kunicki TJ, et al. Laminin stimulates spreading of platelets through integrin α 6 β 1-dependent activation of GPVI. *Blood* 2006;107:1405–12. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2406>.
21. Riba R, Hughes CE, Graham A, Watson SP, Naseem KM. Globular adiponectin induces platelet activation through the collagen receptor GPVI-Fc receptor gamma chain complex. *J Thromb Haemost* 2008;6:1012–20. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.02982.x>.

22. Jandrot-Perrus M, Lagrue AH, Okuma M, Bon C. Adhesion and activation of human platelets induced by convulxin involve glycoprotein VI and integrin alpha2beta1. *J Biol Chem* 1997;272:27035–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.43.27035>.
23. Horii K, Brooks MT, Herr AB. Convulxin forms a dimer in solution and can bind eight copies of glycoprotein VI: implications for platelet activation. *Biochemistry* 2009;48:2907–14. <https://doi.org/10.1021/bi801820q>.
24. Sang Y, Huskens D, Wichapong K, de Laat B, Nicolaes GAF, Roest M. A Synthetic Triple Helical Collagen Peptide as a New Agonist for Flow Cytometric Measurement of GPVI-Specific Platelet Activation. *Thromb Haemost* 2019;119:2005–13. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1697660>.
25. Lier M van, Verhoef S, Cauwenberghs S, Heemskerck JWM, Akkerman J-WN, Heijnen HFG. Role of membrane cholesterol in platelet calcium signalling in response to VWF and collagen under stasis and flow. *Thromb Haemost* 2008;99:1068–78. <https://doi.org/10.1160/TH07-08-0528>.
26. Goswami D, Gowrishankar K, Bilgrami S, Ghosh S, Raghupathy R, Chadda R, et al. Nanoclusters of GPI-anchored proteins are formed by cortical actin-driven activity. *Cell* 2008;135:1085–97. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.032>.
27. Izquierdo I, Barrachina MN, Hermida-Nogueira L, Casas V, Eble JA, Carrascal M, et al. Platelet membrane lipid rafts protein composition varies following GPVI and CLEC-2 receptors activation. *J Proteomics* 2019;195:88–97. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.01.014>.
28. Мартянов АА, Канева ВН, Пантелеев МА, Свешникова АН. CLEC-2-индуцированная внутриклеточная сигнализация в тромбоцитах крови. *Биомед химия* 2018;64:387–96. <https://doi.org/10.18097/PBMC20186405387>.
29. Мартянов АА, Канева ВН, Пантелеев МА, Свешникова АН. Физиологические и патофизиологические аспекты активации тромбоцитов крови через рецептор CLEC-2. *Онко-гематология* 2018;13:83–90. <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2018-13-3-83-90>.
30. Stone MB, Shelby SA, Núñez MF, Wisser K, Veatch SL. Protein sorting by lipid phase-like domains supports emergent signaling function in B lymphocyte plasma membranes. *eLife* 2017;6:e19891. <https://doi.org/10.7554/eLife.19891>.
31. Gupta N, DeFranco AL. Lipid rafts and B cell signaling. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2007;18:616–26. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.07.009>.
32. Jury EC, Flores-Borja F, Kabouridis PS. Lipid rafts in T cell signalling and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2007;18:608–15. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.08.002>.
33. Falck E, Patra M, Karttunen M, Hyvönen MT, Vattulainen I. Lessons of slicing membranes: interplay of packing, free area, and lateral diffusion in phospholipid/cholesterol bilayers. *Biophys J* 2004;87:1076–91. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.041368>.
34. Боздаганян МЕ, Шайтан КВ. Исследование структуры рафтов биологических мембран методами компьютерного моделирования. *Клиническая Практика* 2016:66–72.
35. Quinter PG, Dangelmaier CA, Quinton TM, Kunapuli SP, Daniel JL. Glycoprotein VI agonists have distinct dependences on the lipid raft environment. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2007;5:362–8. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02309.x>.
36. Locke D, Chen H, Liu Y, Liu C, Kahn ML. Lipid Rafts Orchestrate Signaling by the Platelet Receptor Glycoprotein VI*. *Journal of Biological Chemistry* 2002;277:18801–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111520200>.
37. Bodin S, Tronchère H, Payrastre B. Lipid rafts are critical membrane domains in blood platelet activation processes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2003;1610:247–57. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00022-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00022-1).
38. Bovellan M, Romeo Y, Biro M, Boden A, Chugh P, Yonis A, et al. Cellular control of cortical actin nucleation. *Curr Biol* 2014;24:1628–35. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.05.069>.
39. Kelkar M, Bohec P, Charras G. Mechanics of the cellular actin cortex: From signalling to shape change. *Current Opinion in Cell Biology* 2020;66:69–78. <https://doi.org/10.1016/j.cob.2020.05.008>.
40. Svitkina TM. Actin Cell Cortex: Structure and Molecular Organization. *Trends Cell Biol* 2020;30:556–65. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.03.005>.
41. Treanor B, Depoil D, Gonzalez-Granja A, Barral P, Weber M, Dushek O, et al. The Membrane Skeleton Controls Diffusion Dynamics and Signaling through the B Cell Receptor. *Immunity* 2010;32:187–99. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.12.005>.
42. Jaqaman K, Grinstein S. Regulation from within: the cytoskeleton in transmembrane signaling. *Trends Cell Biol* 2012;22:515–26. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.07.006>.
43. Li J, Yin W, Jing Y, Kang D, Yang L, Cheng J, et al. The Coordination Between B Cell Receptor Signaling and the Actin Cytoskeleton During B Cell Activation. *Front Immunol* 2019;9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03096>.
44. Jaumouillé V, Farkash Y, Jaqaman K, Das R, Lowell CA, Grinstein S. Actin Cytoskeleton Reorganization by Syk Regulates Fcγ Receptor Responsiveness by Increasing Its Lateral Mobility and Clustering. *Developmental Cell* 2014;29:534–46. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.04.031>.
45. Shi W, Ye B, Rame M, Wang Y, Cioca D, Reibel S, et al. The receptor tyrosine kinase EPHB6 regulates catecholamine exocytosis in adrenal gland chromaffin cells. *J Biol Chem* 2020;295:7653–68. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013251>.
46. Papakonstanti EA, Stournaras C. Cell responses

- regulated by early reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Letters* 2008;582:2120–7. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.02.064>.
47. Стеряков АА. Об одном универсальном методе построения моделей для сложных многоагентных систем. *Компьютерные Исследования и Моделирование* 2013;5:513–23.
 48. Bonabeau E. Agent-based modeling: Methods and techniques for simulating human systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002;99:7280–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.082080899>.
 49. ElKalaawy N, Wassal A. Methodologies for the modeling and simulation of biochemical networks, illustrated for signal transduction pathways: A primer. *Biosystems* 2015;129:1–18. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2015.01.008>.
 50. Deventer S van, Arp AB, Spriel AB van. Dynamic Plasma Membrane Organization: A Complex Symphony. *Trends in Cell Biology* 2021;31:119–29. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.11.004>.
 51. Burkhart JM, Vaudel M, Gambaryan S, Radau S, Walter U, Martens L, et al. The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood* 2012;120:e73–82. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-416594>.
 52. Prior IA, Muncke C, Parton RG, Hancock JF. Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J Cell Biol* 2003;160:165–70. <https://doi.org/10.1083/jcb.200209091>.
 53. Ceñido JF, Itin B, Stark RE, Huang Y, Oquendo MA, John Mann J, et al. Characterization of lipid rafts in human platelets using nuclear magnetic resonance: A pilot study. *Biochem Biophys Rep* 2017;10:132–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.005>.
 54. Saffman PG, Delbrück M. Brownian motion in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72:3111–3. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.8.3111>.
 55. Jung SM, Moroi M, Soejima K, Nakagaki T, Miura Y, Berndt MC, et al. Constitutive Dimerization of Glycoprotein VI (GPVI) in Resting Platelets Is Essential for Binding to Collagen and Activation in Flowing Blood. *J Biol Chem* 2012;287:30000–13. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.359125>.
 56. Tantiwong C, Dunster JL, Cavill R, Tomlinson MG, Wierling C, Heemskerk JWM, et al. An agent-based approach for modelling and simulation of glycoprotein VI receptor diffusion, localisation and dimerisation in platelet lipid rafts. *Sci Rep* 2023;13:3906. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30884-6>.
 57. Haining EJ, Matthews AL, Noy PJ, Romanska HM, Harris HJ, Pike J, et al. Tetraspanin Tspan9 regulates platelet collagen receptor GPVI lateral diffusion and activation. *Platelets* 2017;28:629–42. <https://doi.org/10.1080/09537104.2016.1254175>.
 58. Treanor B, Depoil D, Bruckbauer A, Batista FD. Dynamic cortical actin remodeling by ERM proteins controls BCR microcluster organization and integrity. *The Journal of Experimental Medicine* 2011;208:1055. <https://doi.org/10.1084/jem.20101125>.
 59. Mattila PK, Batista FD, Treanor B. Dynamics of the actin cytoskeleton mediates receptor cross talk: An emerging concept in tuning receptor signaling. *J Cell Biol* 2016;212:267–80. <https://doi.org/10.1083/jcb.201504137>.
 60. Tolar P. Cytoskeletal control of B cell responses to antigens. *Nat Rev Immunol* 2017;17:621–34. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.67>.
 61. Gomes de Castro MA, Wildhagen H, Sograte-Idrissi S, Hitzing C, Binder M, Trepel M, et al. Differential organization of tonic and chronic B cell antigen receptors in the plasma membrane. *Nature Communications* 2019;10:820. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08677-1>.
 62. Jaqaman K, Kuwata H, Touret N, Collins R, Trimble WS, Danuser G, et al. Cytoskeletal control of CD36 diffusion promotes its receptor and signaling function. *Cell* 2011;146:593–606. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.049>.
 63. Maqsood Z, Clark JC, Martin EM, Cheung YFH, Morán LA, Watson SET, et al. Experimental validation of computerised models of clustering of platelet glycoprotein receptors that signal via tandem SH2 domain proteins. *PLoS Comput Biol* 2022;18:e1010708. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010708>.
 64. Dunster JL, Mazet F, Fry MJ, Gibbins JM, Tindall MJ. Regulation of Early Steps of GPVI Signal Transduction by Phosphatases: A Systems Biology Approach. *PLOS Computational Biology* 2015;11:e1004589. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004589>.
 65. Dunster JL, Unsworth AJ, Bye AP, Haining EJ, Sowa MA, Di Y, et al. Interspecies differences in protein expression do not impact the spatiotemporal regulation of glycoprotein VI mediated activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2020;18:485–96. <https://doi.org/10.1111/jth.14673>.
 66. Stepanyan MG, Filkova AA, Garzon Dasgupta AK, Martyanov AA, Sveshnikova AN. Platelet Activation through GPVI Receptor: Variability of the Response. *Biochem Moscow Suppl Ser A* 2021;15:73–81. <https://doi.org/10.1134/S1990747820050074>.
 67. Martyanov AA, A MA, Stepanyan MG, Г CM, Sveshnikova AN, H CA. Theoretical Explanation for the Variability in Platelet Activation through the GPVI Receptor. *Biologičeskie membrany* 2023;40:112–21. <https://doi.org/10.31857/S0233475523020044>.
 68. Chugh P, Clark AG, Smith MB, Cassani DAD, Dierkes K, Ragab A, et al. Actin cortex architecture regulates cell surface tension. *Nat Cell Biol* 2017;19:689–97. <https://doi.org/10.1038/ncb3525>.
 69. Korobkin J, Proenza Garcia A, Sveshnikova A.

- A minimal mathematical model of neutro-phil pseudopodium formation during chemotaxis. *Systems Biology and Physiology Reports* 2021;1:6. <https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202103012>.
70. Korobkin J, Sveshnikova A. A possible approach to computer simulation of the formation of platelet lamellipodia. *Systems Biology and Physiology Reports* 2022;1:9. <https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202263012>.
 71. Schaus TE, Taylor EW, Borisy GG. Self-organization of actin filament orientation in the dendritic-nucleation/array-treadmilling model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007;104:7086–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701943104>.
 72. Pollard TD, Berro J. Mathematical Models and Simulations of Cellular Processes Based on Actin Filaments*. *Journal of Biological Chemistry* 2009;284:5433–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800043200>.
 73. Machta BB, Papanikolaou S, Sethna JP, Veatch SL. Minimal Model of Plasma Membrane Heterogeneity Requires Coupling Cortical Actin to Criticality. *Biophysical Journal* 2011;100:1668–77. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.02.029>.
 74. Honigsmann A, Sadeghi S, Keller J, Hell SW, Eggeling C, Vink R. A lipid bound actin meshwork organizes liquid phase separation in model membranes. *eLife* 2014;3:e01671. <https://doi.org/10.7554/eLife.01671>.

Ограничения применения метода оценки старшего показателя Ляпунова для оценки сложности кальциевых осцилляций

Limitations of the application of the method of estimating the highest Lyapunov exponent for assessing the complexity of calcium oscillations

Л.С. Ведерников^{1#}, С.В. Галкина^{1,2}, А.Н. Свешникова^{1,2,3}.

L.S. Vedernikov^{1#}, S.V. Galkina^{1,2}, A.N. Sveshnikova^{1,2,3}.

1. Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Россия, 109029, г. Москва, ул. Средняя Калитниковская, д. 30
2. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Россия, 117997, г. Москва, ул. Саморы Машела, д. 1
3. Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия, 119991, г. Москва, Ленинские Горы, д. 1, корп. 2

Автор для переписки: lsv89314@mail.ru

1. Center for Theoretical Problems of Physico-chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, 30 Srednyaya Kalitnikovskaya st., Moscow, 109029, Russia
2. Dmitry Rogachev National Medical Research Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, 1 Samory Mashela st., Moscow, 117997, Russia
3. Lomonosov Moscow State University, 1/2 Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russia

Получено: 25.11.2025

Принято к публикации: 30.12.2025

Опубликовано: 31.12.2025

EDN: XJGZXP

DOI: 10.65189/2949-0758-2025-4-1-16-21

Аннотация

Ионы кальция — ключевые вторичные мессенджеры в системе внутриклеточной сигнализации. Для верификации детерминированного хаоса в подобных динамических системах традиционно используется метод оценки старшего показателя Ляпунова (λ_{\max}). Однако его применение требует тщательной предобработки экспериментальных данных, что ограничивает спектр задач, в которых может быть использована эта оценка. В данной работе мы рассмотрели применимость метода λ_{\max} к временным рядам кальциевых осцилляций, экспериментально зарегистрированных в одиночных тромбоцитах человека. Нашей целью было показать, что комплексная сложность осцилляций варьируется в зависимости от агониста, и для этой задачи был предложен метод оценки старшего показателя Ляпунова. Однако анализ выявил, что полученные сигналы обладают выраженной нестационарностью, включающей дрейф амплитуды и длительные периоды отсутствия динамики. Это приводит к ложноотрицательным результатам при расчёте показателя Ляпунова. Построенные двумерные фазовые портреты демонстрируют смещение и «сплющивание» траекторий, что отражает эволюцию статических свойств сигнала, а не устойчивую структуру аттрактора. В результате расчёт λ_{\max} для таких

данных приводит к артефактным результатам: визуально схожие временные ряды выдают противоположные значения: как положительные (указывающие на хаос), так и отрицательные (соответствующие устойчивой динамике). Таким образом, применение показателя Ляпунова к необработанным экспериментальным кальциевым сигналам тромбоцитам некорректно. Для получения достоверных результатов требуется предварительно устранить нестационарный компонент или использовать альтернативные методы анализа.

Ключевые слова: Показатель Ляпунова, Кальциевая сигнализация, Тромбоциты.

Annotation

Calcium ions are key secondary messengers in intracellular signaling. The largest Lyapunov exponent (λ_{\max}) is traditionally used to verify deterministic chaos in such dynamical systems. However, its application requires thorough preprocessing of experimental data, which limits the range of tasks for which this metric can be reliably used. In this work, we examined the applicability of λ_{\max} estimation to time series of calcium oscillations experimentally recorded in individual human platelets. Our aim was to demonstrate that the structural complexity of oscillations varies depending on the agonist, and that the Lyapunov exponent could potentially serve as

a quantitative metric for this purpose. However, the analysis revealed that the recorded signals exhibit pronounced nonstationarity—including amplitude drift and extended periods of minimal activity—leading to false-negative outcomes in Lyapunov analysis. The constructed two-dimensional phase portraits show shifting and “flattening” of trajectories, reflecting the evolution of the statistical properties of the signal rather than a stable attractor structure. As a result, λ_{\max} computed for such data produces artefactual outcomes: visually similar time series yield opposite values, ranging from positive (indicating chaos) to negative (corresponding to stable dynamics). Thus, applying the Lyapunov exponent to raw experimental platelet calcium signals is inappropriate. Reliable results require prior removal of nonstationary components or the use of alternative analytical approaches.

Key words: Lyapunov exponent, calcium signaling, platelets.

Введение

Старший показатель Ляпунова (λ_{\max}) — один из наиболее чувствительных и информативных инструментов для анализа динамических систем, который широко применяется для выявления и подтверждения хаотического поведения в их эволюции. Использование этого метода для изучения внутриклеточных процессов, в частности колебаний концентрации ионов кальция (Ca^{2+}), позволило установить, что эти флуктуации не случайны, а отражают сложную нелинейную динамику системы регуляции ионного обмена. Ионы кальция играют важную роль вторичного мессенджера в клетках, кодируя широкий спектр физиологических процессов — от активации ферментов и экспрессии генов до секреции, мышечного сокращения и апоптоза. Проведенные ранее исследования показали, что кальциевые осцилляции имеют детерминированно-хаотическую структуру, что существенно изменило представления о механизмах клеточной сигнализации и открыло новые перспективы для понимания фундаментальных принципов функционирования живых клеток.

Одним из ключевых исследований, впервые продемонстрировавших хаотическую природу колебаний концентраций ионов кальция, является работа Houart и соавторов [1]. Авторы исследовали модель кальциевых осцилляций, возникающих в результате нелинейной обратной связи между концентрацией Ca^{2+} и метаболизмом инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3). Они показали, что различным типам динамики — периодическому, квазипериодическому и хаотическому — соответствуют разные аттракторы в фазовом

пространстве: предельный цикл, тор и странный аттрактор. В этой же работе впервые для Ca^{2+} -сигнализации был вычислен старший показатель Ляпунова (λ_{\max}), что количественно подтвердило наличие хаотического поведения в моделируемых осцилляциях.

Дальнейшее развитие идеи исследования кальциевой сигнализации методом оценки старшего показателя Ляпунова представлено в работе Rückl и соавторов [2]. Авторы провели численный расчёт λ_{\max} для моделируемых сигналов и показали, что переход от регулярных к хаотическим режимам сопровождается изменением знака λ_{\max} . Это стало количественным подтверждением детерминированной природы хаоса в системе внутриклеточного кальциевого обмена.

Прямое экспериментальное подтверждение этих выводов было получено в работе Kosuta и соавторов [3], где методику расчёта λ_{\max} впервые применили к флуоресцентным данным, регистрирующим ядерные колебания Ca^{2+} в клетках растений. Авторы изучали, как общий сигнальный путь симбиоза у бобовых (Sym pathway), включающий белки DMI1, DMI2 и DMI3, различает сигналы от двух типов симбиотических партнёров: азотфиксирующих бактерий (ризобий) и арбускулярных микоризных грибов. Было установлено, что хаотическая динамика (подтвержденная положительным показателем Ляпунова) объясняет, как один и тот же сигнальный путь может быть гибко настроен на восприятие различных внешних стимулов при минимальных изменениях параметров системы.

В последние годы растёт интерес к численному анализу «сложности» кальциевых сигналов, например, для сравнения реакций тромбоцитов человека на разные агонисты или условия активации. Для подобной задачи одним из инструментов потенциально может являться метод оценки старшего показателя Ляпунова, однако такое применение некорректно: λ_{\max} предназначен не для классификации степени вариативности или информативности сигналов, а исключительно для диагностики детерминированного хаоса в стационарных временных рядах.

В реальных биологических экспериментах временные ряды кальциевых колебаний, как правило, нестационарны. Для них характерны дрейф базовой линии, постепенное изменение амплитуды и частоты пиков, а также переходы между различными режимами осцилляций. В таких условиях расчёт λ_{\max} приводит к артефактным результатам, лишённым физического смысла. Для адекватного применения данного метода необходимо предварительно устранять нестационарности экспериментальных данных,

как это было сделано, например, в работе [3].

Целью настоящей работы является теоретическое обоснование ограничений применения показателя Ляпунова для анализа кальциевых осцилляций на примере экспериментальных данных, полученных из тромбоцитов человека. На основе анализа временных рядов и соответствующих фазовых портретов показано, что нестационарность данных приводит к систематическому занижению λ_{\max} , что делает данный показатель непригодным для количественной оценки структурной сложности сигнала.

Материалы и Методы

Для регистрации внутриклеточной концентрации Ca^{2+} тромбоциты окрашивались флуоресцентным кальций-чувствительным красителем Calbryte-590AM (Molecular probes, Eugene, State Oregon, США). Антитела VM64 к PECAM-1/CD31 (RRID:AB_782149) были предоставлены профессором А.В. Мазуровым (ФГБУ «НМИЦ кардиологии», Москва, РФ). Все остальные реагенты производства компании Sigma-Aldrich (San Diego, CA, США). Материалы для изготовления проточных камер поставлялись компаниями «ГемаКор» (Москва, Россия) и «МедСил» (Мытищи, Россия).

Буферные растворы

Для работы с тромбоцитами в проточных камерах использовался модифицированный буфер Tyrode's. Состав буфера: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM NaHCO_3 , 0,36 mM NaH_2PO_4 , 1 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES (pH 7,35), 0,36% BSA и 1 г/л глюкозы. Буфер BRB-80 (80 mM PIPES/КОН, pH 6,9, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl_2) использовался для подготовки поверхности стекла и нанесения антител VM64 к PECAM-1/CD31.

Сборка проточной камеры

Плоско-параллельная проточная камера собиралась на основе предметного стекла (с входным и выходным отверстиями на расстоянии 42 мм, трубочки прикреплялись к стеклу термоклеем) и покровного стекла, предварительно силанизированного для обеспечения адгезии белков. Более подробно метод сборки описан в [4]. Внутренний канал между стеклами формировался с помощью двусторонней клеевой ленты толщиной 0,2 мм. Готовая герметичная система позволяла контролируемо заменять растворы в камере. Для создания адгезивной подложки, не активирующей тромбоциты, в камеру последовательно вводили:

- 1) Раствор антител VM64 (40 мкг/мл) в

буфере BRB-80 (инкубация 15 мин).

- 2) Раствор буфера BRB-80.
- 3) Раствор Pluronic F-127 (1%) (инкубация 10 мин).
- 4) Раствор буфера BRB-80.
- 5) Раствор буфера Тирода для финальной промывки.

Забор крови и этические нормы

Для экспериментов использовалась цельная кровь здорового взрослого добровольца в течение 3 часов после забора. Кровь забирали в пробирку объемом 1,6 мл, содержащую гирудин (> 525 антитромбиновых единиц, S-Monovette®, SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany). Исследования проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрены этическим комитетом ЦТФ ПХФ РАН (решение №1 от 12.01.2018 г.). От донора было получено письменное информированное согласие.

Загрузка красителя в клетки

Цельная кровь инкубировалась с 2мкМ CalBryte-590AM и апиразой (0.3 ед.акт./мл) в течение 30 минут при 37 °С. После инкубации кровь использовали немедленно.

Регистрация кальциевых ответов тромбоцитов

Проточная камера устанавливалась на флуоресцентный TIRF-микроскоп. Кровь вводили в камеру при низкой скорости перфузии, обеспечивая адгезию тромбоцитов к антителам VM64. Далее несвязанные клетки смывали буфером Tyrode's с адреналином 400 нг/мл. Регистрацию флуоресценции проводили в режиме TIRF с низкой интенсивностью возбуждения и частотой съёмки 12 кадров/с при постоянной перфузии. Сначала в течение 5 минут регистрировали базовую активацию тромбоцитов. Затем буфер заменяли на свежий, содержащий адреналин 400 нг/мл и 10 μM АДФ, и проводили съёмку кальциевых осцилляций на новом поле зрения. Для каждого тромбоцита, активированного АДФ, извлекали временные ряды интенсивности флуоресценции. Полученные сигналы обрабатывали путём вычитания фона и последующей нормализации.

Обработка экспериментальных данных

Старший показатель Ляпунова λ_{\max} является фундаментальным индикатором устойчивости динамических систем и позволяет дифференцировать регулярные и хаотические режимы. Применительно к кальциевым осцилляциям этот параметр служит инструментом для верификации наличия детерминированного хаоса, который отражает внутреннюю нелинейную

динамику системы, а не случайные внешние воздействия. Данный методологический подход открывает возможность для более глубокого понимания механизмов самоорганизации и регуляции клеточных процессов, обусловленных кальциевыми сигналами.

Старший показатель Ляпунова λ_{\max} описывает среднюю скорость расхождения близких траекторий в фазовом пространстве: положительное значение λ_{\max} указывает на хаотический режим, нулевое — на периодические или квазипериодические колебания, отрицательное — на устойчивое равновесие. Подробное математическое описание данного подхода представлено в классических работах [5, 6].

При работе с экспериментальными данными, когда система уравнений, описывающая динамику системы, неизвестна, фазовое пространство восстанавливают методом временного встраивания (метод временной задержки) [7]. После фазовой реконструкции вычисляется средняя дивергенция соседних точек во времени, из которой по линейному участку зависимости определяется λ_{\max} . В данной работе применялся стандартный алгоритм Розенштейна, реализованный в программной среде MatLab.

Корректность реконструкции фазового пространства в значительной степени определяется выбором двух ключевых параметров: временной задержки τ и размерности m , используемой для встраивания фазового пространства. В рамках данного исследования временную задержку τ определяли на основе временного масштаба, при котором автокорреляционная функция достигала значения, близкого к $1/e$. Размерность фазового пространства была определена с использованием критерия ложных ближайших соседей [8].

Помимо вышеперечисленных шагов, экспериментальные временные ряды предварительно отфильтровывали от шумового фона. Для подавления высокочастотного шума без искажения формы и амплитуды кальциевых пиков применяли вейвлет-фильтрацию [9]. Также для увеличения точности расчётов проводили интерполяцию экспериментальных данных, удваивая количество точек.

Необходимо подчеркнуть, что корректная оценка старшего показателя Ляпунова возможна лишь при соблюдении ряда условий: временной ряд должен быть стационарным, достаточно длинным и содержать устойчивые осцилляции без перехода между режимами. При наличии дрейфа амплитуды, изменения частотных характеристик или значительного уровня шума, показатель Ляпунова утрачивает свою физическую интерпретируемость и не способен адекватно

отражать внутреннюю динамику исследуемой системы. Следует отметить, что в работах [1, 2] анализировались теоретические осцилляции, лишённые шума, дрейфа и нестационарности. В работе [3] же исследовались экспериментальные данные, изначально обладавшие сильной нестационарностью, которая выражалась в виде плавного дрейфа базовой линии и в присутствии длинных участков без пиков. Однако, авторы в данной работе проводили многоступенчатую предварительную обработку исходных данных, которая позволила применить метод оценки λ_{\max} для анализа.

Результаты

Характер экспериментальных данных

В ходе работы были проанализированы временные ряды кальциевых осцилляций, зарегистрированные в одиночных тромбоцитах человека. Наблюдения показали, что даже в идентичных экспериментальных условиях тромбоциты демонстрируют разнообразие динамических паттернов. На основе частоты и формы осцилляций все наблюдаемые режимы можно разделить на четыре условные группы.

Первая группа характеризуется редкими одиночными спайками и длительными участками отсутствия какой-либо динамики. Вторая группа демонстрирует регулярную динамику кальциевых пиков с умеренной вариабельностью амплитуды. Третья группа содержит более высокочастотную последовательность пиков и образование характерных кластеров. Последняя, четвертая группа характеризуется стабильно высоким уровнем интенсивности флуоресценции в конце съёмки. Все четыре группы представлены на рисунке 1.

Несмотря на существенные различия между описанными типами динамики, все эти временные ряды обладают общей чертой — выраженной нестационарностью. Она проявляется в виде постепенного затухания амплитуды, спонтанной смены режимов колебаний и чередования активных сегментов с пассивными участками, лишёнными осцилляторной активности. Из четырех выделенных групп только вторая и третья могут быть использованы для применения метода оценки старшего показателя Ляпунова, при предварительной обработке сигнала как в работе [3].

Фазовые портреты

Для каждого из четырёх типов динамики были построены двухмерные фазовые портреты, показанные на рисунке 2. Данные графики позволяют визуализировать геометрию траектории в двумерном реконструированном

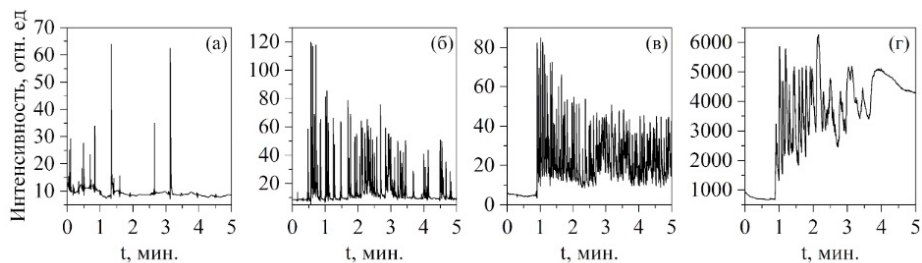


Рисунок 1. Кальциевые осцилляции тромбоцитов человека. (а) – первая группа, (б) – вторая группа, (в) – третья группа, (г) – четвертая группа.

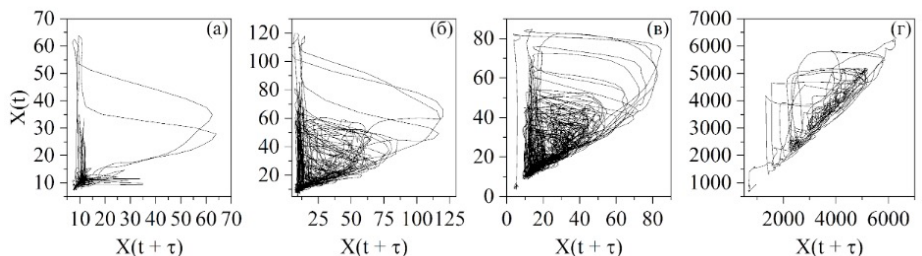


Рисунок 2. Двухмерные фазовые портреты для кальциевых осцилляций. (а) – первая группа, (б) – вторая группа, (в) – третья группа, (г) – четвертая группа.

пространстве состояний.

При переходе от первой группы к третьей траектории усложняются, и внешне портреты становятся похожими на структуру, характерную для квазирегулярных или хаотичноподобных колебаний. Однако во всех случаях наблюдается одна важная особенность: дрейф фазовой траектории во времени. Вместо того чтобы формировать компактный аттрактор, как в работе [1, 3], траектория постепенно смещается в пространстве состояний вслед за изменением средней амплитуды сигнала. Такой дрейф приводит к тому, что соседние траектории, лежащие близко друг к другу в начальный момент времени, не расходятся экспоненциально, как должно быть в случае детерминированного хаоса, а постепенно сходятся в связи с уменьшением амплитуды и «сплющиванием» облака точек. Наиболее отчетливо это видно для четвертой группы. Ранний сегмент траектории образует

крупную петлю, тогда как поздний сегмент сжимается в малую линейную область фазового пространства.

Следствие нестационарности: влияние на оценку λ_{max}

В качестве проверки применимости метода для оценки сложности кальциевых осцилляций тромбоцитов были рассчитаны старшие показатели Ляпунова для двух временных рядов (см. Рисунок 3), полученных в одном эксперименте с добавлением 10 мкМ АДФ.

Несмотря на визуальную схожесть двух временных рядов мы в итоге получаем два диаметрально противоположных результата. Первый временной ряд (см. Рисунок 3(а)) имеет $\lambda_{max} = 2.695$, что формально свидетельствует о хаотичной динамике. В то же время внешне похожий сигнал (см. Рисунок 3(б)) имеет значение $\lambda_{max} = -0.354$. Из-за больших участков отсутствия

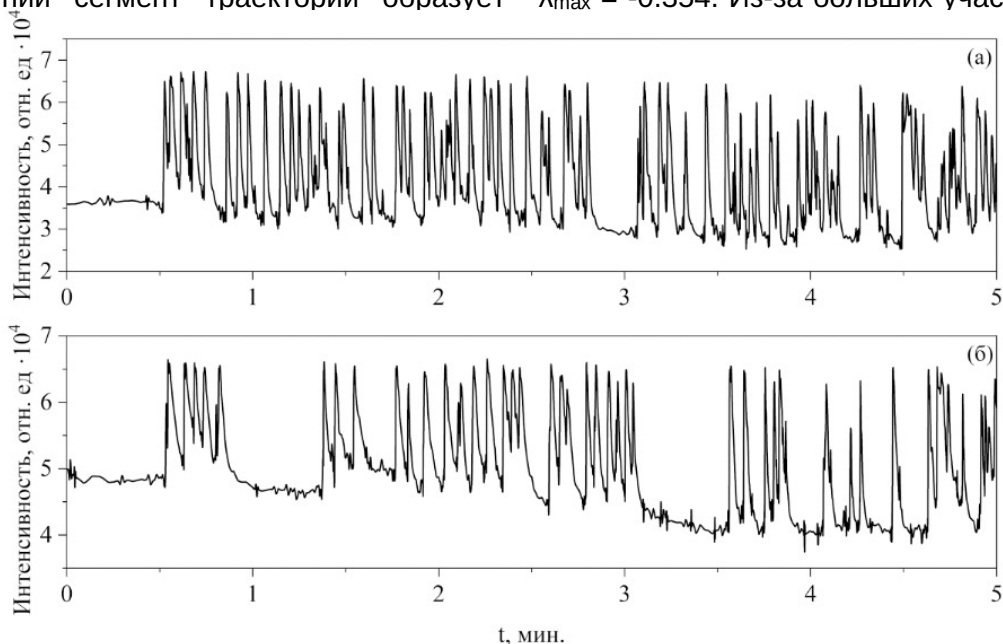


Рисунок 3. Зависимость интенсивности флуоресценции от времени первого тромбоцита (а) и второго тромбоцита (б).

осцилляторной активности оценка старшего показателя Ляпунова дает ложноотрицательный результат, указывающий на устойчивую равновесную динамику.

Обсуждение

Результаты проведенного исследования позволяют лучше понять границы применимости метода оценки старшего показателя Ляпунова (λ_{\max}) для анализа экспериментальных биологических данных. Метод λ_{\max} остается надежным и валидным инструментом в тех случаях, когда основная задача состоит в подтверждении наличия хаоса в экспериментальных данных, как показано в работах [1–3]. В таких системах временные ряды являются стационарными, а фазовое пространство формирует устойчивый аттрактор, необходимый для качественного применения метода.

Однако в случае анализа реальных данных, таких как кальциевые осцилляции в тромбоцитах, без проведения специализированной предварительной обработки, ситуация кардинально меняется. Ключевой проблемой является выраженная нестационарность сигналов, проявляющаяся в дрейфе амплитуды и в наличии протяженных периодов низкой активности. В этих условиях оценка λ_{\max} теряет физическую интерпретируемость и перестает отображать внутреннюю вариативность или структурную сложность сигнала. Как показали наши результаты, визуально схожие временные ряды могут давать диаметрально противоположные значения — от положительных, указывающих на хаос, до отрицательных, соответствующих устойчивой динамике. Это указывает на методологическую несостоятельность данного подхода без предварительной нормализации и удаления нестационарности данных.

Таким образом, показатель Ляпунова не может быть использован в качестве количественной метрики «сложности» кальциевых осцилляций при сравнении различных агонистов или физиологических состояний. В условиях сильной нестационарности и зашумления данных более корректными являются методы, основанные на рекуррентном или энтропийном анализе.

Вклад авторов

Концептуализация, методология, Л.С., С.В. и А.Н.; программное обеспечение, Л.С.; валидация, формальный анализ, Л.С., С.В. и А.Н.; ресурсы, курирование данных, А.Н.; письменность — подготовка первоначального черновика, Л.С.; написание — рецензирование и редактирование, Л.С., С.В.; визуализация, Л.С.; администрация проекта, приобретение финансирования, А.Н. Все авторы прочитали и согласились с

опубликованной версией рукописи.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Финансирование

Это исследование финансировалось Российским научным фондом, номер гранта 23-74-00057.

Список литературы

1. Houart, G., Dupont, G., & Goldbeter, A. (1999). Bursting, chaos and birhythmicity originating from self-modulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate signal in a model for intracellular Ca^{2+} oscillations. *Bulletin of Mathematical Biology*, 61(3), 507–530.
2. Perc, M., & Marhl, M. (2003). Sensitivity and flexibility of regular and chaotic calcium oscillations. *Biophysical Chemistry*, 104(2), 509–522.
3. Kosuta, S., Held, M., Hossain, M. S., et al. (2008). Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(28), 9823–9828. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803496105>
4. Protocols.io. (n.d.). Cover glass silanization and preparation of flow chamber (Version 1). <https://doi.org/10.17504/protocols.io.n92ld6ny7g5b/v1>.
5. Wolf, A., Swift, J. B., Swinney, H. L., & Vastano, J. A. (1985). Determining Lyapunov exponents from a time series. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 16(3), 285–317.
6. Rosenstein, M. T., Collins, J. J., & De Luca, C. J. (1993). A practical method for calculating largest Lyapunov exponents from small data sets. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 65(1–2), 117–134.
7. Takens, F. (1981/2006). Detecting strange attractors in turbulence. In *Dynamical Systems and Turbulence*, Warwick 1980 (pp. 366–381). Springer. (Original work presented 1979/80).
8. Kennel, M. B., Brown, R., & Abarbanel, H. D. I. (1992). Determining embedding dimension for phase-space reconstruction using a geometrical construction. *Physical Review A*, 45(6), 3403–3411.
9. Mallat, S. G. (1989). A theory for multiresolution signal decomposition: The wavelet representation. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 11(7), 674–693. <https://doi.org/10.1109/34.192463>.

Ультрочувствительность и пороги в киназных и протеазных каскадах

Ultrasensitivity and thresholds in cascades of kinases and proteases

Т.И. Кадыров^{1#}.

T. I. Kadyrov^{1#}.

1. Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Россия, 109029, г. Москва, ул. Средняя Калитниковская, д. 30

Автор для переписки: kadyrov.ti17@physics.msu.ru

1. Center for Theoretical Problems of Physico-chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, 30 Srednyaya Kalitnikovskaya st., Moscow, 109029, Russia

Получено: 07.12.2025

Принято к публикации: 30.12.2025

Опубликовано: 31.12.2025

EDN: UORTPS

DOI: 10.65189/2949-0758-2025-4-1-22-29

Аннотация

Понимание общих закономерностей регуляторных систем живых организмов представляет большой научный интерес. В настоящем обзоре литературы рассматриваются сходства и различия физиологических задач, механизмов преобразования сигнала и подходов, применяемых для моделирования киназных и протеазных каскадов. В то время как для киназных каскадов характерны обратимые реакции и квазистационарное поведение, каскады протеаз демонстрируют необратимые переходы и импульсную динамику. Таким образом, при схожести структуры и некоторых динамических особенностей, эти системы демонстрируют существенные динамические различия.

Ключевые слова: Ультрочувствительность, Порог, Киназы, Протеазы, Обратная связь, Стационарные состояния, Бистабильность.

Annotation

Understanding of general principles of regulatory systems in living organisms is of great scientific interest. This literature review examines the similarities and differences in the physiological tasks, signal transduction mechanisms, and approaches used to model kinase and protease cascades. While kinase cascades are characterized by reversible reactions and quasi-steady-state behavior, protease cascades exhibit irreversible transitions and excitable dynamics. Thus, despite similar structures and some dynamic features, these systems exhibit significant dynamic differences.

Key words: Ultrasensitivity, Threshold, Kinases, Proteases, Feedback loop, Steady states, Bistability.

Введение

Регуляторные системы играют ключевую роль в функционировании живых систем. Они позволяют координировать энергетические, структурные, двигательные и другие процессы в соответствии с текущим состоянием внешней и внутренней среды и оперативно реагировать на их изменения. Функции конкретных регуляторных систем можно всегда описать как некоторое преобразование сигнала, который вызывает некоторый ответ регулируемой системы. При этом в разных контекстах под сигналом и ответом могут пониматься различные вещи: это может быть дифференциация клетки в ответ на изменение концентрации гормона и образование фибринового сгустка при контакте плазмы крови с тканями вне сосудистого русла [1, 2].

Типы преобразования сигнала также очень разнообразны [3, 4]. Зачастую для решения физиологической задачи преобразование производится нелинейным образом. Часто от системы требуется обеспечение такого уровня входного сигнала, что при более низких его уровнях ответ системы отсутствует или почти отсутствует, но при его превышении ответ системы резко возрастает. Существует несколько разновидностей такой динамики: ультрочувствительность и порог, с которым часто связано явление гистерезиса.

В основе организации взаимодействия элементов сигнальной системы часто лежит каскад [1, 5], в котором между сигналом и ответом лежат несколько промежуточных элементов, участвующих в преобразовании сигнала. В настоящей статье рассматриваются две группы таких систем, основанных на разных химических принципах: ковалентная модификация посредством фосфорилирования и частичный протеолиз. Сходная классификация каскадов на циклические (киназные) и не циклические

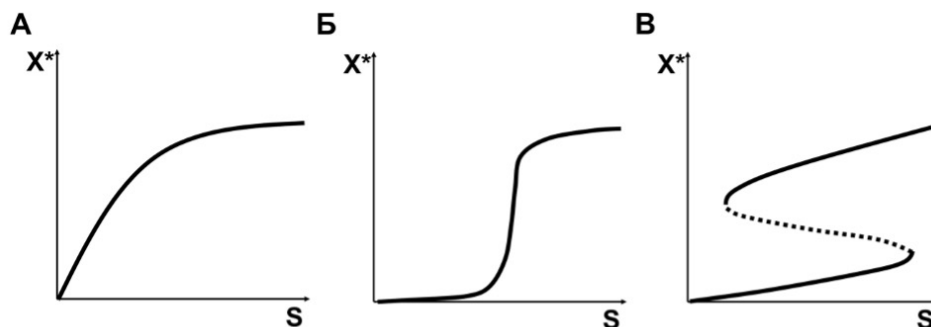


Рисунок 1. Типичные качественные зависимости фосфорилированной формы в киназных каскадах от стационарного стимула S: гиперболическая (кривая Михаэлиса-Ментен, возникает в отсутствии насыщения [3]) (А), сигмоидная (ультрачувствительность) (Б), бистабильность с гистерезисом (В) – переход между ветвями кривой происходит при разном S в зависимости от его предыдущих значений.

(протеазные) приводится в [6]. В обоих типах наблюдаются нелинейные пороговые свойства, указанные выше. При внешнем сходстве организации этих систем возникает вопрос: как велико сходство их динамических свойств в контексте их физиологических задач?

Киназные каскады

Одним из распространённых типов внутриклеточной регуляции являются киназные каскады. Их базовым элементом является фермент, для которого присоединение или отсоединение фосфатной группы играет роль переключателя, переводящего фермент из не активной формы в активную. Например, в системе регуляции синтеза гликогена у животных присоединение одного фосфата активирует киназу фосфорилазы и протеинфосфатазу 1 и инактивирует гликогенсинтазу. Фосфорилирование и дефосфорилирование происходят под действием ферментов киназ и фосфатаз соответственно.

В классической работе Гольдштейна и Кошланда 1981 г. [7] рассматривается простейшая система из одного фермента X, существующего в дефосфорилированной и фосфорилированной формах, а также киназы и фосфатазы, которые катализируют реакции перехода между этими формами. При этом суммарная концентрация фермента остаётся постоянной. В качестве входа этой системы рассматривается концентрация киназы, а выхода – количество фосфорилированной формы фермента X^* . В данной системе при любом стационарном уровне сигнала на входе этой системы выходное значение также принимает фиксированное стационарное значение, определяемое параметрами системы.

Авторами было показано, что в случае, когда киназа и фосфатаза близки к насыщению, зависимость сигнал-ответ чрезвычайно напоминает кривую кооперативного связывания кислорода гемоглобином. Наклон этой кривой вблизи полумаксимального ответа оказывается больше, чем у кривой Михаэлиса-

Ментен. Это явление было названо авторами ультрачувствительностью, а, поскольку этот эффект достигался при насыщении ферментов, когда их активность выходит на плато – ультрачувствительностью нулевого порядка.

В подобных системах изменение входного сигнала с течением времени лишено сложной динамики. Для выполнения своей задачи системе достаточно различать кратковременный и продолжительный внешний сигнал [8,9]. Поэтому для описания поведения таких систем достаточно зависимости сигнал-ответ и лаг-тайма, за который система достигает нового стационарного состояния при изменении входного сигнала. В этом заключается, с одной стороны, удобство их моделирования, а, с другой стороны, одно из отличий от других каскадных систем.

Ещё одной особенностью этих систем является то, что при любых изменениях состояния в ней могут быть задействованы одни и те же молекулы белков. Реакции производства и утилизации белков не играют существенной роли для понимания ответа, поскольку характерные лаг-таймы существенно меньше характерных времён этих реакций [7]. Такая организация позволяет клетке сделать систему регуляции, которая не требует затрачивать ресурсы на постоянное производство лишних белков. Это позволяет ограничиваться порой всего несколькими тысячами молекулами на клетку (например, у дрожжей [1]).

Существуют и другие способы создания ультрачувствительной зависимости сигнал-ответ даже в отсутствие модифицирующих ферментов [1]. Если включение фермента требует двойного фосфорилирования, то скорость образования его активной формы пропорциональна квадрату концентрации киназы. В результате зависимость сигнал-ответ в области малых значений входного сигнала также пропорциональна его квадрату, а при увеличении сигнала выходит на плато, что создаёт большую чувствительность ответа, чем у кривой Михаэлиса. Подобная система соответствует каскаду MAPK в ооцитах шпорцевой

лягушки [10].

Ещё одним механизмом является наличие ингибитора киназы, который приводит к сильному снижению ответа при низком уровне входного сигнала (сравнимом с концентрацией ингибитора) [1]. При высокой аффинности ингибитора ответ системы в этой области может снижаться практически до нуля, что приводит к тому, что зависимость сигнал-ответ выглядит как кривая Михаэлиса, сдвинутая вправо на величину, равную концентрации ингибитора. При более слабой аффинности ингибитора в области слабых входных сигналов зависимость практически совпадает со случаем двухэтапного фосфорилирования, но при повышении входного сигнала достигает стационара медленнее.

Как в случае двойного фосфорилирования, так и в случае наличия ингибитора, для математического описания системы также достаточно расчёта стационарной зависимости сигнал-ответ и лаг-таймов при изменении входного сигнала.

После работы Гольдбетера и Кошланда разными авторами было исследовано множество систем, основанных на этом базовом модуле (называемом иногда петлёй Гольдбетера-Кошланда [11]), которые могут модифицировать и усиливать возникающую в нём ультрачувствительность. В частности, исследовались каскады таких ферментов, где активная форма является активатором для следующей ступени. Для всего каскада в целом входом является вход первой ступени, а выходом – выход последней. В работах [12–14] было показано, что зависимость сигнал-ответ для всего такого каскада в целом может быть даже более сигмоидной, чем у каждой ступени по-отдельности за счёт того, что каждая ступень «умножает» ультрачувствительность предыдущей. Для математически строгого описания этого эффекта вводятся коэффициенты чувствительности

$$r_m = \frac{d \ln(E_m)}{d \ln(E_{m-1})}$$

(где E_i – концентрация фермента на ступени с номером i), характеризующие наклон кривой сигнал-ответ при заданной концентрации E_m , и коэффициенты Хилла h_m , позволяющие охарактеризовать ультрачувствительность кривой сигнал-ответ на данной ступени в целом (которая для этого аппроксимируется уравнением Хилла.

$$E_m \approx \frac{a_m \left(\frac{E_m}{b_m}\right)^{h_m}}{1 + \left(\frac{E_m}{b_m}\right)^{h_m}}$$

Чем больше эти характеристики, тем больше ультрачувствительность. Непосредственной подстановкой легко убедиться, что, если r_m

рассчитываются в согласованных точках кривых последовательных ступеней каскада, локальный коэффициент чувствительности для каскада в целом

$$r = \frac{d \ln(E_n)}{d \ln(E_0)} = r_1 r_2 \dots r_n$$

где n – номер последней ступени, $E_0 = S$. Для оценки верхней границы коэффициента Хилла для каскада в целом рассмотрим две последовательные ступени $m-1$ и m . Если b_{m-1} достаточно велик, то E_{m-1} и E_m описываются следующими выражениями:

$$E_{m-1} \approx a_{m-1} \left(\frac{E_{m-1}}{b_{m-1}}\right)^{h_{m-1}}$$

$$E_m \approx \frac{a_m \left(\frac{a_{m-1}}{b_m}\right)^{h_m} \left(\frac{E_{m-1}}{b_{m-1}}\right)^{h_{m-1} h_m}}{1 + \left(\frac{a_{m-1}}{b_m}\right)^{h_m} \left(\frac{E_{m-1}}{b_{m-1}}\right)^{h_{m-1} h_m}}$$

Таким образом, коэффициент Хилла для каскада в целом $h \leq h_1 h_2 \dots h_n$. Такое усиление чувствительности по каскаду может приводить к ещё более резкому переключению между «выключенным» и «включённым» состояниями системы, что подтверждается экспериментально для каскада МАРК у шпорцевой лягушки [10].

Ещё одним механизмом увеличения ультрачувствительности в зависимости сигнал-ответ является двойная роль входного сигнала, когда он активирует реакцию включения фермента и ингибирует его выключение [15].

Однако, как замечают авторы [3], какой бы высокий наклон не имела кривая сигнал-ответ в подобных системах, она всегда остаётся непрерывной. В таких системах также отсутствует гистерезис. Тем не менее, существуют примеры физиологических систем, в которых наблюдается резкий и необратимый переход из одного состояния в другое. Примером таких процессов является дифференциация клеток [16,17].

Эти динамические свойства могут быть достигнуты посредством других систем, рассмотренных в [12]. Как и в работе Гольдбетера и Кошланда, рассматриваются системы с одним ковалентно модифицируемым ферментом, однако киназа и фосфатаза находятся в области кинетики первого порядка, и дополнительно вводится положительная обратная связь: активная форма фермента катализирует реакцию активации собственной неактивной формы. Для такой системы динамические свойства кардинально меняются.

Центральную роль при этом играет обратная связь. Для анализа таких систем применяется метод разомкнутой положительной обратной связи [18], при котором строится зависимость

сигнал-ответ в отсутствие обратной связи и выделяются такие точки, в которых система останется устойчивой даже при её обратном замыкании. В работе [12] показано, что при наличии нелинейной положительной обратной связи в системе Гольдбетера-Кошланда возникает бистабильность. Также бистабильность может возникнуть и при линейной кинетике положительной обратной связи, если фосфатаза находится в области насыщения. Это связано с тем, что скорость образования активной формы в обратной связи сама по себе задаётся нелинейной (квадратичной) функцией, поскольку она пропорциональна как концентрации прекурсора (неактивной формы X), так и самой активной форме ($X^* = X_{tot} - X$), сумма которых постоянна ($X + X^* = X_{tot}$).

Любопытно, что бистабильность может существовать и в отсутствие явного молекулярного механизма автокатализа, и быть реализованной только с помощью двухэтапного непротессивного фосфорилирования. В работе [19] показано, что в условиях, когда киназа и/или фосфатаза находятся в области насыщения, бистабильность

может возникать на уровне одной ступени киназного каскада. Этот эффект связан с тем, что при увеличении концентрации конечной дважды модифицированной формы (X^*) при условии равновесия скоростей фосфорилирования и дефосфорилирования происходит перераспределение пула нефосфорилированной и однократно фосфорилированной формы ($X + X^* = X_{tot} - X^{**}$) в пользу последней, что приводит к увеличению скорости образования дважды фосфорилированной формы.

Наличие в системе сразу двух положительных обратных связей может придавать системе большую устойчивость к изменению параметров. Так, в работе [20] показано, что в системе с одновременным действием нелинейных положительной и двойной отрицательной обратных связей (подобной системе CDK1-Wee1-Cdc25) бистабильность возникает в более широком диапазоне параметров, чем при действии этих обратных связей по-отдельности.

Стоит также отметить, что организация регуляторной системы в виде каскада открывает разнообразные возможности для взаимодействия

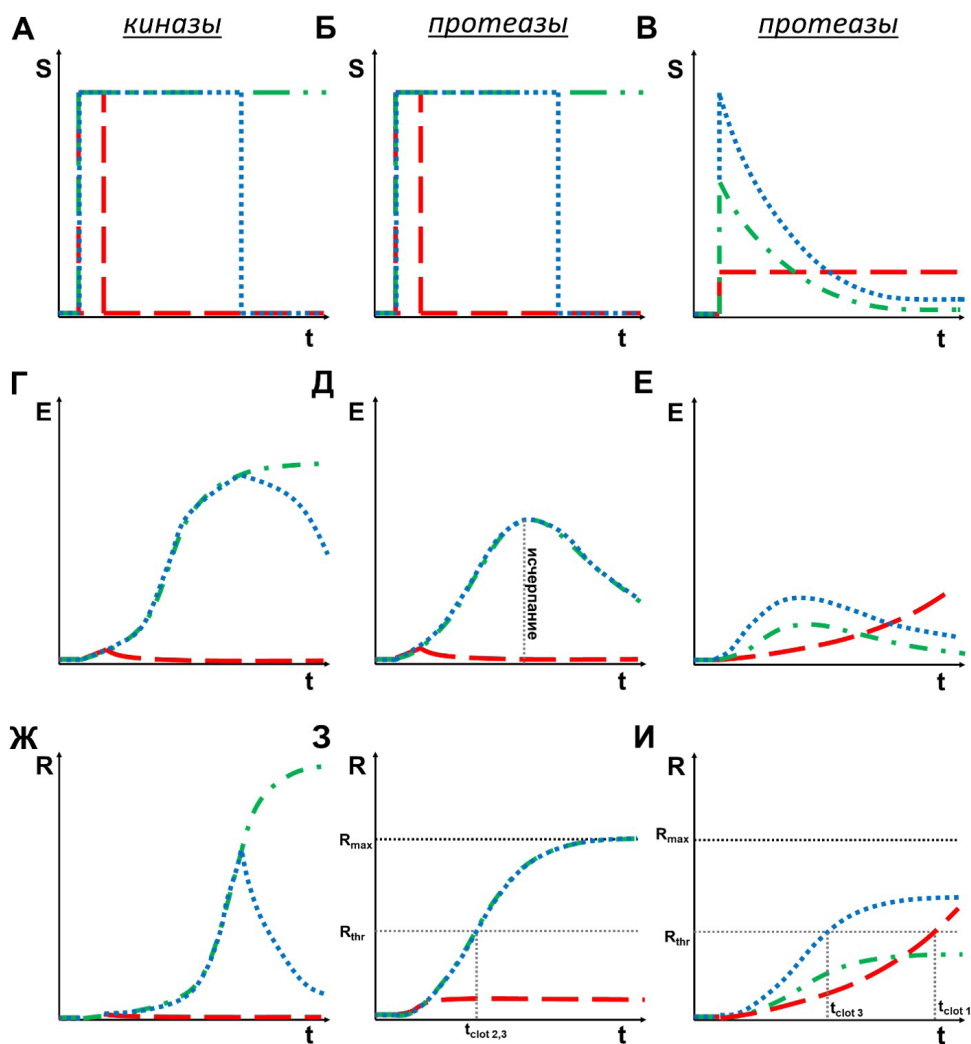


Рисунок 2. Качественные зависимости от времени переменных киназных каскадов типа MAPK (первый столбец: А, Г, Ж) и протеазных каскадов типа свёртывания крови (второй и третий столбец: Б, В, Д, Е, З, И) без обратных связей. Верхний ряд (А-В) – временные зависимости внешнего сигнала S, средний ряд (Г-Е) – временные зависимости промежуточных ферментов E, нижний ряд (Ж-И) – временные зависимости эффектора R. См. комментарии в тексте.

с другими системами, которые могут оказывать своё влияние на разных ступенях каскада [8]. Например, в работе [9] показана роль положительных обратных связей между системой АКТ, отвечающей за реакцию клетки на инсулин, и каскадом MAPK. Межсистемные положительные обратные связи организуют их как сопряжённую дважды бистабильную систему, в которой включение одной стабилизирует другую в выключенном состоянии. В работе [21] показано, что взаимодействие между несколькими каскадами MAPK в одной клетке делает возможным более сложные динамические эффекты, такие как регуляция уровня порога переключения одного каскада (JNK) при активации других (ERK и p38), а также регулируемое выключение положительной обратной связи внутри каскада (регулируемое АКТ).

Существуют и другие более сложные механизмы контроля преобразования сигнала в киназных каскадах, такие как разделение и локализация активности ферментов скаффолд-белками [8], стабилизация, выключение или осцилляции под действием отрицательных обратных связей [8,21,22].

Протеазные каскады

Регуляторные системы, организованные в виде каскада, не ограничиваются внутриклеточными системами из нескольких ферментов, подвергаемых ковалентной модификации. Другой большой и важной группой каскадных систем являются протеазные каскады. К ним относятся свёртывание крови, воспаление, регуляция артериального давления, фибринолиз, комплемент, каскад металлопротеиназ матрикса, а также дорсо-вентральная система морфогенеза. Также к протеазным каскадам относится внутриклеточный каскад апоптоза [23, 24].

Первым отличием, которое бросается в глаза для таких систем, является необратимость активации фермента, вытекающая из её протеолитического характера. Из этого следует, что суммарная концентрация неактивной и активной форм не может сохраняться с течением времени. Таким образом, в этих системах невозможна ультрачувствительность нулевого порядка.

В протеолитических каскадах также, как и в киназных, возможны стационарные состояния. Однако, они имеют другой характер: находясь в них, система всё время расходует прекурсоры и ингибирует активные формы. Таким образом, возникает равновесный поток вещества через систему. Подобный пример исследуется в работе [24]. Авторы рассматривают систему из двух ферментов, активирующих друг друга по

степенному закону, каждый из которых имеет реакции образования из неактивного прекурсора и ингибирования. В свою очередь, каждый прекурсор имеет свою независимую скорость образования и деградации и равновесную концентрацию, которая понижается при активации системы. В этой системе существуют два стационарных состояния, которые на фазовой диаграмме имеют вид особых точек типа узел.

Ещё одной особенностью протеолитических каскадов является физиологическая роль их временной динамики. В таких системах, как свёртывание крови, время ответа играет решающую роль для их физиологических задач. В работе [2] было показано, что реакция ингибирования активаторного комплекса VIIa–TF–Ха является контролирующей для времени свёртывания в гомогенной системе. Наличие этой реакции приводит к экспоненциальному уменьшению уровня входного сигнала с течением времени, и её отсутствие кардинально меняет динамику активатора. Таким образом, для таких систем может иметь значение не только уровень активатора, но и его зависимость от времени.

В системах, подобных свёртыванию, важны не стационарные состояния, а начальные и конечные концентрации. Для таких систем более характерен импульсный, а не стационарный ответ. Поэтому для таких систем зависимость сигнал-ответ может иметь другой смысл: вместо стационарного уровня входного сигнала используется его начальное значение, а вместо стационарного уровня ответа – его конечное значение (например, полное количество образовавшегося фибрина в процессе свёртывания).

Импульсный характер ответа таких систем демонстрируется в работе Бельтрами и Джести [23]. Авторы рассматривали системы, основанные на имевшихся на тот момент данных о каскаде свёртывания. В их моделях концентрации прекурсоров задавалась константой в соответствии с тем, что на физиологически значимых временах и расстояниях свёртывания более информативно и легче рассматривать поведение системы, линеаризованной вблизи нулевого стационарного состояния. В такой системе в зависимости от соотношения параметров система или всегда возвращается к нулевым значениям концентраций активных факторов (нулевое стационарное состояние устойчиво) или концентрации активных факторов экспоненциально удаляются от нуля (нулевое стационарное состояние неустойчиво).

Поскольку протеазные каскады чаще всего имеют внеклеточную локализацию, важным фактором, отличающим их от киназных, является та роль, которую потоки могут играть в их динамике. В работе [25] авторы

показывают, как бистабильность может возникнуть в простой открытой системе только с эффективной кинетикой действующих масс и одной положительной обратной связью. Авторы используют приближение хорошо перемешиваемого реактора с постоянным притоком и оттоком. В такой системе может существовать асимптотическая бистабильность при определённых ограничениях сверху на силу положительной обратной связи и скорость потока, определяемых параметрами системы. В качестве активатора авторы используют начальную концентрацию автокатализирующего фермента Y , соответствующего тромбину в свёртывании крови. В качестве ответа системы авторы используют интеграл $Y(t)$, коррелирующий с количеством образовавшегося фибрина, и обнаруживают резкий подъём в зависимости сигнал-ответ, соответствующий переключению бистабильности. Таким образом, даже в отсутствии сильной нелинейности в положительной обратной связи система может демонстрировать бистабильность и крутое переключение ответа при наличии потоков.

Случай, описанный выше, является не единственным, когда несколько линейных эффектов создают нелинейность. Среди других результатов, в работе [2] была получена редуцированная модель каскада свёртывания в гомогенной системе, учитывающая две длинные положительные обратные связи через VIII и XI факторы. С помощью редуцирования полной системы с помощью теоремы Тихонова было показано, что эти линейные обратные связи приводят к существованию в системе квадратичной нелинейности, эффективно объединяясь в одну, что подтверждается анализом полной системы. В результате в этой системе существует порог бистабильности, проявляющейся до исчерпания факторов. Стоит отметить, что эта бистабильность функционально связана не с переключением ответа фибрина в гомогенной системе, а с распространением

активации в пространстве.

Ещё одной особенностью протеазных каскадов, определяемой их внеклеточной локализацией, являются сложные пространственные эффекты. Так, в работе [26] авторы показывают, как каскад свёртывания крови может реагировать на очень локальную активацию одиночным фибробластом (с активатором TF на мембране), игнорируя большую, но более пространственно-однородную концентрацию активатора. Такая динамика обеспечивается за счёт комбинации двух положительных обратных связей на двух уровнях каскада (между факторами Xa и VIIa, а также IIa и Va), диффузии и ингибированию.

Интересно отметить аналогию между скаффолд-белками киназ и мембранами активированных тромбоцитов для протеаз каскада свёртывания. В обоих случаях происходит локализация, сближение взаимодействующих факторов каскада и ускорение реакций [8,27]. Любопытно, что в самом процессе связывания протеаз с мембранами наблюдается гистерезис, что может защищать активированные факторы от вымывания потоком [28].

Заключение

На рис. 1 приведено сравнение качественной динамики киназных и протеазных каскадов. Эффекты обратных связей опущены для простоты. При кратковременном внешнем стимуле (красные кривые в первом и втором столбце) ответ эффектора киназных каскадов с течением времени возвращается в исходное (нулевое) стационарное состояние, в то время как в киназных каскадах концентрация эффектора может оказаться ненулевой (например, в свёртывании крови при неактивных положительных обратных связях это приводит к образованию неполноценного фибринового сгустка [2]). Также, в то время как в протеазных каскадах с течением времени концентрации промежуточных ферментов каскада выходят на ненулевую стационар при постоянном стимуле, в протеазных каскадах может играть роль исчерпание прекурсоров, что приводит к убыванию концентраций ферментов (при этом после исчерпания динамика системы не зависит от изменений внешнего стимула). Последний столбец рис. 1 демонстрирует динамику системы при более характерном для свёртывания крови виде стимула с экспоненциальным убыванием в сравнении со слабой, но постоянной активацией. В такой системе существует порог уровня начальной концентрации S , при которой эффектор может достигнуть критического значения, вызывающего функциональный ответ (ср. зелёную (штрих-пунктир) и синюю (пунктир) кривые на фиг. И). Однако при постоянной активации, когда

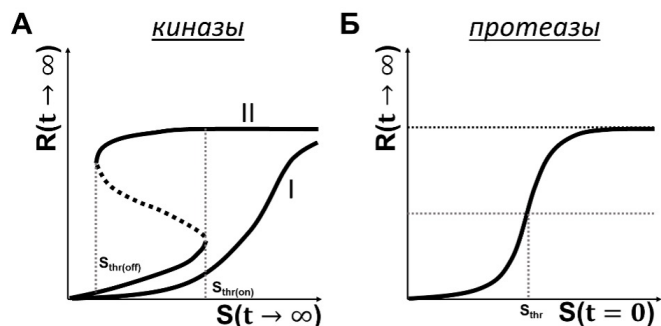


Рисунок 3. Качественные зависимости сигнал-ответ для киназных (А) и протеазных (Б) систем. На (А) сплошной линией показаны устойчивые стационарные состояния, пунктиром – неустойчивые. Отмечены пороговые значения. На фиг. А линия I – в отсутствии ПОС, линия II – при активной ПОС.

отсутствует ингибирование внешнего сигнала, порог отсутствует, поскольку в этом случае даже слабого сигнала будет достаточно для активации системы за достаточно большое время.

На рис. 2 качественно показаны зависимости сигнал-ответ для киназных и протеазных каскадов (типа свёртывания крови). Важно отметить разный смысл параметра по горизонтальной оси: для киназных каскадов это стационарное значение активатора, в то время как для свёртывания крови это его начальная концентрация. Порог переключения, который чаще всего имеют в виду в работах по киназным каскадам, имеет характер резкого переключения между двумя ветвями кривой, в то время как для свёртывания крови речь идёт об определённой точке на плавной зависимости, которая выделена из-за её физиологического значения (критическая концентрация фибрина, при которой происходит его полимеризация).

Таким образом, при внешнем сходстве организации, киназные и протеазные каскады могут демонстрировать принципиально разные динамические режимы и работают в разных физиологических контекстах, ставящих перед ними разные задачи. Киназные каскады большую часть времени находятся в стационарных состояниях, переходя между ними непрерывно и квазистационарно при плавных изменениях входного сигнала (определяемого, например, концентрацией гормона вне клетки) или так же обратимо переключаясь между ними с небольшой задержкой при его быстрых изменениях. Задержка при переключении позволяет фильтровать кратковременные и реагировать только на длительные внешние стимулы [6]. В то же время, перед протеазными каскадами обычно стоят задачи регуляции необратимых процессов, требующих резкого и необратимого переключения, таких как свёртывание крови. Внеклеточная локализация не позволяет организовать такие каскады на основе фосфорилирования из-за высокой концентрации кальция или

на основе гидролиза фосфонуклеотидов из-за их низкой концентрации. Кроме того, существуют свидетельства эволюционного родства протеазных каскадов, участвующих в морфогенезе, гемостазе и иммунитете [5], что позволяет частично объяснить, почему в этих системах используется один и тот же механизм активации ферментов.

Вместе с тем существуют определённые условия, когда оба типа каскадов могут проявлять одинаковую динамику (см. табл. 1). А именно, когда истощением неактивных форм можно пренебречь (из-за их избытка или из-за акцента на начальных стадиях), становится неважным, какой характер имеет реакция, уменьшающая концентрацию активной формы – дефосфорилирование, сохраняющего суммарный пул фермента, или ингибирование, выводящего фермент из пула [6]. В этом случае функционально динамика систем не отличается. Однако при моделировании важно учитывать, какой характер имеет динамика стимула, как физиологический ответ системы связан с концентрацией и длительностью активации её эффектора и какие допущения для прекурсоров уместно сделать, поскольку все эти факторы могут существенно влиять на поведение системы.

Благодарности

Автор выражает благодарность Анастасии Никитичне Свешниковой и Михаилу Александровичу Пантелееву за советы при написании рукописи.

Финансирование

Эта работа финансировалась РФФИ, номер гранта 23-74-00057.

Список литературы

1. Ferrell JE. Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs. Trends Biochem Sci. 1996

ОДУ	Смысл приближения	Тип системы
$\dot{P} = 0$	Исчерпание отсутствует или пренебрежимо мало	Киназные и протеазные каскады
$\dot{P} = \dots - v_{on}$	Учитывается истощение, восстановление прекурсора из активной формы отсутствует	Протеазные каскады
$\dot{P} = \dots - v_{on} + v_{off}$	Учитывается истощение и восстановление прекурсора из активной формы	Киназные каскады
$\dot{P} = \dots + fP_0 - fP - v_{on}$	Учитывается приток и отток	Протеазные каскады

Таблица 1. Способ задания концентрации прекурсора P, наиболее часто используемый при моделировании киназных и протеазных каскадов. v_{on} – скорость образования активной формы, v_{off} – скорость перехода активной формы в неактивную, f – скорость потока, P_0 – начальная концентрация прекурсора.

- Dec;21(12):460–6.
2. Panteleev MA, Balandina AN, Lipets EN, Ovanesov MV, Ataullakhanov FI. Task-oriented modular decomposition of biological networks: trigger mechanism in blood coagulation. *Biophys J*. 2010 May 19;98(9):1751–61.
 3. Tyson JJ, Chen KC, Novak B. Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Curr Opin Cell Biol*. 2003 Apr;15(2):221–31.
 4. Ferrell JE. Self-perpetuating states in signal transduction: positive feedback, double-negative feedback and bistability. *Curr Opin Cell Biol*. 2002 Apr;14(2):140–8.
 5. Krem MM, Cera ED. Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation. *Trends Biochem Sci*. 2002 Feb 1;27(2):67–74.
 6. Varón R, Havsteen BH, Valero E, Molina-Alarcón M, García-Cánovas F, García-Moreno M. Kinetic analysis of the transient phase and steady state of open multicyclic enzyme cascades. *Acta Biochim Pol*. 2005;52(4):765–80.
 7. Goldbeter A, Koshland DE. An amplified sensitivity arising from covalent modification in biological systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Nov;78(11):6840–4.
 8. Kolch W, Calder M, Gilbert D. When kinases meet mathematics: the systems biology of MAPK signalling. *FEBS Lett*. 2005 Mar 21;579(8):1891–5.
 9. Arkun Y. Dynamic Modeling and Analysis of the Cross-Talk between Insulin/AKT and MAPK/ERK Signaling Pathways. Morrione A, editor. *PLOS ONE*. 2016 Mar 1;11(3):e0149684.
 10. Huang CY, Ferrell JE. Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Sep 17;93(19):10078–83.
 11. Giaroli M, Bihan F, Dickenstein A. Regions of multistationarity in cascades of Goldbeter-Koshland loops [Internet]. arXiv; 2018 [cited 2025 Dec 4]. Available from: <http://arxiv.org/abs/1807.08400>
 12. Ferrell JE, Ha SH. Ultrasensitivity part III: cascades, bistable switches, and oscillators. *Trends Biochem Sci*. 2014 Dec;39(12):612–8.
 13. Ferrell JE. How responses get more switch-like as you move down a protein kinase cascade. *Trends Biochem Sci*. 1997 Aug;22(8):288–9.
 14. Brown GC, Hoek JB, Kholodenko BN. Why do protein kinase cascades have more than one level? *Trends Biochem Sci*. 1997 Aug;22(8):288.
 15. Goldbeter A, Koshland DE. Ultrasensitivity in biochemical systems controlled by covalent modification. Interplay between zero-order and multistep effects. *J Biol Chem*. 1984 Dec 10;259(23):14441–7.
 16. Ferrell JE, Xiong W. Bistability in cell signaling: How to make continuous processes discontinuous, and reversible processes irreversible. *Chaos Woodbury N*. 2001 Mar;11(1):227–36.
 17. Lewis J, Slack JM, Wolpert L. Thresholds in development. *J Theor Biol*. 1977 Apr 7;65(3):579–90.
 18. Angeli D, Ferrell JE, Sontag ED. Detection of multistability, bifurcations, and hysteresis in a large class of biological positive-feedback systems. *Proc Natl Acad Sci*. 2004 Feb 17;101(7):1822–7.
 19. Markevich NI, Hoek JB, Kholodenko BN. Signaling switches and bistability arising from multisite phosphorylation in protein kinase cascades. *J Cell Biol*. 2004 Feb 2;164(3):353–9.
 20. Ferrell JE. Feedback regulation of opposing enzymes generates robust, all-or-none bistable responses. *Curr Biol CB*. 2008 Mar 25;18(6):R244–245.
 21. Fey D, Croucher DR, Kolch W, Kholodenko BN. Crosstalk and signaling switches in mitogen-activated protein kinase cascades. *Front Physiol*. 2012;3:355.
 22. Qu Z, MacLellan WR, Weiss JN. Dynamics of the Cell Cycle: Checkpoints, Sizers, and Timers. *Biophys J*. 2003 Dec;85(6):3600–11.
 23. Beltrami E, Jesty J. Mathematical analysis of activation thresholds in enzyme-catalyzed positive feedbacks: application to the feedbacks of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Sep 12;92(19):8744–8.
 24. Eissing T, Waldherr S, Allgöwer F, Scheurich P, Bullinger E. Steady state and (bi-) stability evaluation of simple protease signalling networks. *Biosystems*. 2007;90(3):591–601.
 25. Müller J, Brandt S, Mayerhofer K, Tjardes T, Maegle M. Tolerance and threshold in the extrinsic coagulation system. *Math Biosci*. 2008 Feb;211(2):226–54.
 26. Balandina AN, Shibeko AM, Kireev DA, Novikova AA, Shmirev II, Panteleev MA, et al. Positive feedback loops for factor V and factor VII activation supply sensitivity to local surface tissue factor density during blood coagulation. *Biophys J*. 2011 Oct 19;101(8):1816–24.
 27. Podoplelova NA, Kotova YN, Lipets EN, Ataullakhanov FI, Panteleev MA. [Regulation of Membrane-Dependent Reactions of Blood Coagulation]. *Usp Fiziol Nauk*. 2015;46(4):3–14.
 28. Podoplelova NA, Sveshnikova AN, Kurasawa JH, Sarafanov AG, Chambost H, Vasil'ev SA, et al. Hysteresis-like binding of coagulation factors X/Xa to procoagulant activated platelets and phospholipids results from multistep association and membrane-dependent multimerization. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Jun;1858(6):1216–27.

Математические модели активации протеинкиназы С: текущий статус и перспективы

Mathematical models of Protein-Kinase C activation: current status and future prospects

Н.С. Емельянов^{1#}.
N. S. Emelianov^{1#}.

1. Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет, г. Москва, Россия

Автор для переписки: emelanovnikita53@gmail.com

1. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1-2, Moscow, Russia, 119991

Получено: 01.10.2025

Принято к публикации: 15.12.2025

Опубликовано: 31.12.2025

EDN: HYNBUZ

DOI: 10.65189/2949-0758-2025-4-1-30-34

Аннотация

Протеин киназа С (РКС) – фермент, принадлежащий к семейству сериновых киназ. Этот белок участвует во множестве сигнальных каскадов по всему организму [1], поэтому неудивительно, что активацию РКС множество научных групп пыталось описать с помощью математических моделей.[2-5] Однако, большинство исследователей не вдавались в подробности протекания данной реакции, используя общие методы, например рассматривая ее как простую, или пропуская некоторые промежуточные стадии. Этот подход допустим при изучении определенного круга явлений, однако не подходит для построения более универсальной модели, способной описывать реакцию в широком спектре физиологических состояний живой клетки.

Ключевые слова: Математическая модель, Протеин киназа С, Активация, Клеточная сигнализация, Кальций, Диацилглицерол.

Annotation

Protein kinase C (PKC) is an enzyme belonging to the family of serine kinases. This protein participates in a variety of signaling cascades throughout the body [1], so it is not surprising that many scientific groups have tried to describe PKC activation using mathematical models.[2-5] However, most researchers did not go into details of the course of this reaction, using general methods, for example, considering it as simple, or skipping some intermediate stages. This approach is acceptable when studying a certain range of phenomena, but it is not suitable for constructing a more universal model capable of describing reactions in a wide range of physiological states of a living cell.

Key words: Mathematical model, Protein kinase C, Activation, Cell signaling, Calcium, Diacylglycerol.

Введение

Протеин киназа С (РКС) – фермент, принадлежащий к семейству сериновых киназ. Этот белок участвует во множестве сигнальных каскадов по всему организму [1], поэтому неудивительно, что активацию РКС множество научных групп пыталось описать с помощью математических моделей.[2-5] Однако, большинство исследователей не вдавались в подробности протекания данной реакции, используя общие методы, например рассматривая ее как простую, или пропуская некоторые промежуточные стадии. Этот подход допустим при изучении определенного круга явлений, однако не подходит для построения более универсальной модели, способной описывать реакцию в широком спектре физиологических состояний живой клетки.

Краткое биохимическое описание

Для активации РКС в общем случае требуется присутствие трех активаторов: ионов кальция (Ca^{2+}), фосфатидилсерина (PS) и диацилглицерола (DAG) – сигнальной молекулы, являющейся продуктом реакции с участием фосфатидилинозитол-3-фосфата (PIP3) и фосфолипазы С (PLC) (Рисунок 1). Аналогом DAG в лабораторных условиях могут являться эфиры форбола – дитерпена растительного происхождения. Самым популярным из них является 12-форбол-13-миристаццлеметат (PMA). В ходе реакции фермент поочередно связывает эти вещества, закрепляясь на мембране, где белок переходит в активную конформацию после связывания DAG или PMA. Дополнительно стоит отметить, что существуют достоверные данные о

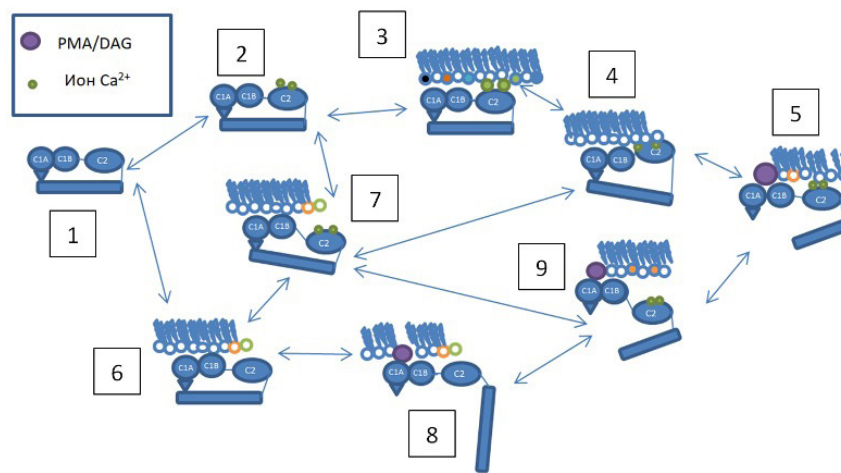


Рисунок 1. Приблизительная схема реакции активации PKC, основанная на литературных данных. 1. PKC в состоянии покоя

2. PKC, связанная с кальцием, в цитозоле
3. PKC, связанная с кальцием и закрепленная на мембране посредством домена C2
4. PKC, связанная с кальцием и закрепленная на мембране посредством доменов C1 и C2.
5. PKC, связанная с кальцием (Домен C2 закреплен на мембране) и DAG/PMA
6. PKC, закрепленная на мембране посредством домена C1
7. PKC, связанная с кальцием и закрепленная на мембране посредством домена C1
8. PKC, связанная с DAG/PMA
9. PKC, связанная с кальцием и DAG/PMA
10. PKC, связанная с кальцием (Домен C2 не закреплен на мембране) и DAG/PMA

кооперативном характере всех вышеописанных связываний [6-10].

Математические модели активации PKC

Одна из наиболее ранних моделей [2] рассматривает процесс активации cPKC как составную часть одного из важнейших внутриклеточных сигнальных путей – MAP-киназного каскада. Авторы рассматривают реакцию как последовательное присоединение молекулы PMA/DAG и молекулы Ca²⁺ без учета стехиометрии реакции, кооперативного характера связывания с PS и мембранно-зависимого характера реакции. Доля концентрации фермента в активной конформации задается следующей формулой (1):

$$[PKC_{act}] = \frac{[DAG] + TPA}{K_P + [DAG] + [TPA]} * \frac{[Ca]}{[Ca] + K_C}$$

Однако, из работ [6-8] известно, что в связывании липидов и кальция наблюдается сильная кооперативность. Именно кооперативность обеспечивает реакции характер переключателя и определяет пороговые концентрации в реакции. При пренебрежении данным фактом характер реакции может существенно измениться. Из работы [8] также можно заметить, что кооперативность сильно влияет на активность фермента, что не отражено в вышенаписанной формуле. В завершение разбора этой модели следует сказать, что авторы не проводят различий между связыванием диацилглицерола и эфиров форбола. Однако PMA и его аналоги связывают PKC намного быстрее и активнее, нежели диацилглицерол

[11-12]. Для этих веществ сильно различаются константы равновесия [11]. Также стоит отметить независимость связывания PMA с PKC от кальция [12-13]. Совокупность фактов показывает, что невозможно считать PMA и DAG равнозначными молекулами, так как их появление вызывает в системе различный отклик и пренебрежение различиями между ними может привести к значительной погрешности предсказываемого результата. При рассмотрении PMA-зависимой активации необходимо учитывать возможность прямой посадки фермента на мембрану, чтобы воспроизвести активацию PKC в условиях отсутствия Ca²⁺ или активацию изоформ семейства pPKC.

В другой работе [3] авторы рассматривают активацию PKC как составной элемент каскада циклического аденозинмонофосфата (сАМФ), играющего центральную роль в сигнализации клетки. Присоединение активаторов рассматривается как несколько последовательных реакций первого порядка. В роли главного активатора рассматривается арахидоновая кислота (AA), в то время как кальций и диацилглицерол являются вспомогательными веществами (Рисунок 2). Однако данный факт противоречит экспериментальным наблюдениям. Показано, что DAG и Ca²⁺ способны активировать фермент в отсутствие AA [14-15]. Так же в схеме присутствуют возможности прямого связывания белка с AA и самостоятельной активации белка, что в физиологических условиях является крайне маловероятным из-за низкой аффинности регуляторного домена PKC к данному активатору [16]. Стоит отметить, что вышеперечисленные

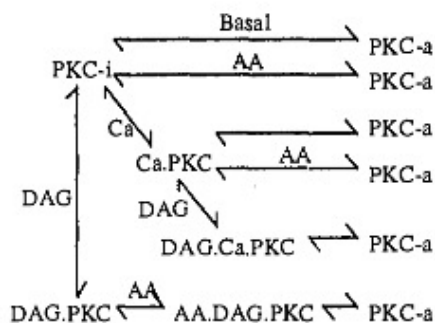


Рисунок 2. Схема реакции в модели [3].

PKC-i – неактивная форма PKC

PKC-a – активная форма PKC

AA – арахидоновая кислота

замечания насчет отсутствия кооперативности связывания активаторов и мембранно-зависимого характера связывания с мембранной относятся и к этой работе.

Авторы модели [4] рассматривают роль фермента в хемотаксисе фибробластов. В данной модели активация PKC рассматривается как реакция первого порядка связывания DAG. Выбранный подход полностью игнорирует концентрацию внутриклеточного кальция, несмотря на его неоднократно отмеченную роль в активации белка. Вышеперечисленные замечания насчет кооперативности связывания активаторов и мембранно-зависимого характера связывания с мембранной остаются справедливыми.

Наиболее новой и точной на момент написания текста является модель [5] авторы описывают кальциевые осцилляции в гепатоцитах. Создатели работают в пределах предстационарного допущения. Модель описывается системой ОДУ (2). Авторы рассматривают активацию cPKC как процесс присоединения двух молекул Ca^{2+} и

$$\frac{d[DAG]}{dt} = K_L[PLC] - K_{-L}[DAG]$$

$$\frac{d[PKC_{resting}]}{dt} = K_{-}[PKC_{active}] - K_{+}[PKC_{resting}]$$

$$\frac{d[PKC_{active}]}{dt} = K_{+}[PKC_{resting}] - K_{-}[PKC_{active}]$$

$$K_{+i} = V_{PKC}[DAG] \frac{K_{ce}^4}{K_{ce}^4 + c_e^4} K_{+e} = V_{PKC}[DAG] \frac{c^2}{K_{PKC}^2 + c^2}$$

	El-Masri et all.	Iyengar et all.	Mohan et all.	Cloete et all.
Учет кооперативности связывания Ca^{2+}/PS	Не учитывается.	Не учитывается.	Не учитывается	Учитывается
Учет поверхностного характера связывания	Не учитывается	Не учитывается	Не учитывается	Не учитывается
Отличие в характере связывания при DAG- и PMA-зависимой активации PKC	Отсутствует	Не рассматривается	Не рассматривается	Не рассматривается

Таблица 1. Анализ различий рассматриваемых математических моделей активации PKC.

одной молекулы DAG.

На данный момент эта модель активации PKC является наиболее полной. Она достаточно подробно описывает процесс активации PKC, точно соответствуя обсуждаемым выше экспериментальным фактам. Из недостатков данной модели стоит отметить недопустимость использования закона действующих масс в чистом виде для описания связывания белка с DAG. Необходимо помнить, что при протекании данной реакции фермент-ионный комплекс и DAG находятся в различных фазах системы: в клеточной мембране и в цитозоле. Поэтому в закон действующих масс необходимо внести поправку, учитывающую этот факт. Другой неточностью модели является исключение из рассмотрения PS, который является важным вспомогательным активаторов, без которого активация белка с помощью DAG крайне затруднительна.

Общим недостатком всех вышеописанных моделей является неспецифичность в вопросе конкретизации изоформы. Показано, что даже в семействе кальций-зависимых изоформ PKC параметры связывания и стехиометрии реакций различаются [17][18]. Поэтому при построении более универсальных моделей фермента требуется уточнять рассматриваемую изоформу, и выбирать специфичные для нее параметры.

План возможной универсальной модели:

Если принять во внимание все вышеперечисленные замечания к моделям активации PKC, можно попытаться предположить, как должна выглядеть модель пригодная для широкого использования (Таблица 1).

Прежде всего важно правильно оценить возможные пути связывания белка с различными активаторами. Например, в случае DAG-зависимой активации PKC следует пренебречь возможностью прямого связывания регуляторного момента с мембраной, ввиду низких темпов активации наблюдаемых в таких экспериментах.

Необходимо также учитывать поверхностный характер реакции, так как он вносит дополнительный вклад в кооперативный характер реакции. Дополнительно стоит учитывать появление дополнительных связывания Ca^{2+} при закреплении на мембране. Это можно осуществить, сделав кинетические параметры связывания регуляторного домена с мембраной, зависящими от концентрации Ca^{2+} , как реализовано в модели [5]. Таким образом, можно достичь в модели схожих с экспериментами показателей кооперативностей и пороговых значений концентраций активатора, тем самым позволяя корректно описывать наблюдаемую в экспериментах активацию PKC.

Для построения полной модели необходимо также учесть различия между изоформами. Этого можно достичь, изменяя константы связывания в различных реакциях. Например, для описания изоформ семейства pPKC можно устремить константы связывания Ca^{2+} к нулю. Различия между изоформами одного же семейства можно описать просто изменяя численные значения таких параметров как аффинность к кальцию, мембране, DAG или PMA.

Заключение

Таким образом, после ознакомления с вышеописанными моделями можно сделать вывод, что существующие математические модели не способны описать активацию фермента в общем случае, оставаясь применимыми в специфичных случаях. Во многих случаях их основные предположения перестанут выполняться. Поэтому системно-биологические исследования соответствующих сигнальных путей требуют построения новой математической модели данного фермента, пригодной для изучения широкого круга физиологических процессов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Это исследование не получало внешнего финансирования.

Список литературы

1. Kikkawa U, Nishizuka Y. THE ROLE OF PROTEIN KINASE C IN TRANSMEMBRANE SIGNALLING. *Ann Rev Cell Bio.* 1986; 2: 149-78.
2. El-Masri HA. Replication Potential of Cells via the Protein Kinase C-MAPK pathway: Application of a Mathematical Mode. *Bulletin of Mathematical Biology.* 1999;61(379-398).
3. Upinder S. Bhalla, Iyengar R. Emergent Properties of Networks of Biological Signaling Pathways. *Science.* 1999;283:381-7.
4. Krithika Mohan, Jamie L. Nosbisch, Timothy C. Elston, James E. Bear, Haugh JM. A Reaction-Diffusion Model Explains Amplification of the PLC/PKC Pathway in Fibroblast Chemotaxis. *Biophysical Journal.* 2017;113:185-94.
5. Ielyaas Cloete, Juliana C. Corrêa-Velloso, Paula J. Bartlett, Vivien Kirk, Andrew P. Thomas, Sneyd J. A Tale of two receptors. *Journal of Theoretical Biology.* 2021;518.
6. Mohammad DB, Nelsestuen GL. Protein Kinase C Interaction with Calcium: A Phospholipid-Dependent Process. *Biochemistry.* 1990;29:7624-30.
7. Martina Medkova, Cho W. Interplay of C1 and C2 Domains of Protein Kinase C in Its Membrane Binding and Activation. *The Journal of Biological Chemistry.* 1999;274(28):19852-61.
8. Newton AC, Daniel E. Koshland J. High Cooperativity, Specificity, and Multiplicity in the Protein Kinase C-Lipid Interactio. *The Journal of Biological Chemistry.* 1989;264(25):14909-15.
9. 16. Dries DR, Newton AC. Kinetic Analysis of the Interaction of the C1 Domain of Protein Kinase C with Lipid Membranes by Stopped-flow Spectroscopy. *The Journal of Biological Chemistry.* 2008;283(12):7885-93.
10. Mosior M, Epand RM. Mechanism of Activation of Protein Kinase C: Roles of Diolein and Phosphatidylserine. *Biochemistry.* 1993;32:66-75.
11. Mosior M, Newton AC. Mechanism of Interaction of Protein Kinase C with Phorbol Esters. *The Journal of Biological Chemistry.* 1995;270(43):25526-33.
12. Mosior M, Newton AC. Calcium-Independent Binding to Interfacial Phorbol Esters Causes Protein Kinase C To Associate with Membranes in the Absence of Acidic Lipids. *Biochemistry.* 1996;35:1612-23.
13. Oancea E, Meyer T. Protein Kinase C as a Molecular Machine for Decoding Calcium and Diacylglycerol Signals. *Cell.* 1998;95:307-18.
14. Zhang G, Marcelo G. Kazanietz, Peter M. Blumberg, Hurley JH. Crystal Structure of the Cys2 Activator-Binding Domain of Protein Kinase C in Complex with Phorbol Ester. *Cell.* 1995;81:917-24.
15. Leonard TA, Rozycki B, Saidi LF, Gerhard Hummer, Hurley JH. Crystal Structure and Allosteric Activation of Protein Kinase C β . *Cell.* 2011;144:55-66.
16. Schaechter JD, Benowitz LI. Activation Membranes of Protein Kinase C by Arachidonic Enhances the Phosphorylation of GAP-43 in Nerve Terminal. *The Journal of Neuroscience.* 1993;13(10):4361-

71.

17. Lisa M. Keranen, Newton AC. Ca Differentially Regulates Conventional Protein Kinase Cs' Membrane Interaction and Activation. The Journal of Biological Chemistry. 1997;272(41):25959-67.
18. Susy C. Kohout, Senena Corbalan-Garcia, Alejandro Torrecillas, Juan C. Gomez-Fernandez, Falke JJ. C2 Domains of Protein Kinase C Isoforms: Activation Parameters and Calcium Stoichiometries of the Membrane-Bound State. Biochemistry. 2002;41:11411-24.

Математическое моделирование в решении сложных биофизических задач

Mathematical modeling in solving complex biophysical problems

Т.А. Коваленко^{1,2#}.

T.A. Kovalenko^{1,2#}.

1. Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Россия, 109029, г. Москва, ул. Средняя Калитниковская, д. 30
2. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Россия, 117997, г. Москва, ул. Саморы Машела, д. 1

Автор для переписки: lsv89314@mail.ru

1. Center for Theoretical Problems of Physico-chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, 30 Srednyaya Kalitnikovskaya st., Moscow, 109029, Russia
2. Dmitry Rogachev National Medical Research Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, 1 Samory Mashela st., Moscow, 117997, Russia

Получено: 20.12.2025

Принято к публикации: 30.12.2025

Опубликовано: 31.12.2025

EDN: WDUTPM

DOI: 10.65189/2949-0758-2025-4-1-35-37

В современной биофизике методы математического моделирования находят применение для решения широкого диапазона задач. Так, подобные подходы применяются для исследования сложных вне- и внутриклеточных систем биохимических реакций, таких как внутриклеточные каскады кальциевой сигнализации [1–5], метаболические пути [6–8], пути апоптоза клетки [9,10], внеклеточные реакции плазменного звена системы свертывания крови [11–14] или системы комплемента [15]. С помощью математических моделей исследуют клеточные системы: например, формирование, рост или контракцию тромба [16–22], агрегацию [23–25] и хемотаксис [26,27] клеток. Множество математических моделей различной сложности было предложено для исследования агрегации белков, формирования и механических свойств полимеров, кластеризации рецепторов на поверхности клетки [20,24,28].

Достаточно детальные и точные математические модели позволяют определять механизмы протекания биологических процессов, предсказывать поведение моделируемой системы в условиях, реализующихся *in vivo*, но при этом труднодостижимых или сложных для наблюдения *in vitro*. В последние годы математическое моделирование активно применяется в области разработки и анализа действия новых лекарственных препаратов [29,30], что потенциально может значительно удешевить доклинические исследования.

В специальном выпуске журнала «Системная биология и физиология» представлены оригинальные исследования и обзорные статьи, посвященные применению математических

моделей для исследования сложных биологических систем. В обзоре Кадырова Т.И. проведен анализ сходств и различий протеазных и киназных каскадов биохимических реакций, сравнены основные типы ответов, реализуемых в таких системах, и отмечены многие интересные аспекты функционирования каскадов, изученные при помощи математического моделирования. Работа Емельянова Н.С. смещает фокус от более общих вопросов устройства каскадов реакций к частным: краткий литературный обзор посвящен функционированию протеинкиназы С, фермента, участвующего во внутриклеточных сигнальных каскадах. В работе рассмотрены основные существующие модели этого фермента, указаны их преимущества и недостатки и приведены соображения относительно построения универсальной математической модели протеинкиназы С.

В оригинальной работе Болдовой А.Е. и соавторов составлена и исследована математическая модель кластеризации и активации трансмембранных рецепторов тромбоцита – гликопротеинов VI. При помощи модели было показано, что степень и характер таяния цитоскелета влияют на кластеризацию рецепторов. В работе Ведерникова Л.С. и соавторов математические подходы были использованы для реконструкции фазового пространства по известным экспериментальным данным для осцилляций внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . В результате авторами показано, что метод оценки старшего показателя Ляпунова неприменим для анализа кальциевых осцилляций в клетке без предварительной обработки данных.

Объединенные в специальном выпуске работы будут интересны для широкой аудитории читателей, связанных с областью системной биологии. Представленные результаты вносят вклад как в понимание общих аспектов функционирования сложных биофизических систем, так и в оценку применимости отдельных методик в их исследовании.

Список литературы

1. Sveshnikova, A.N.; Panteleev, M.A. Signal Transduction and Transformation by the Platelet Activation Cascade: Systems Biology Insights. *Hamostaseologie* 2025, 45, 49–62, doi:10.1055/a-2486-6758.
2. Dupont, G.; Sneyd, J. Recent Developments in Models of Calcium Signalling. *Curr. Opin. Syst. Biol.* 2017, 3, 15–22, doi:https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.03.002.
3. Balabin, F.A.; Korobkina, J.D.D.; Galkina, S. V; Panteleev, M.A.; Sveshnikova, A.N. Personalization of a Computational Systems Biology Model of Blood Platelet Calcium Signaling. *Biomed. Khim.* 2024, 70, 394–402, doi:10.18097/PBMC20247006394.
4. Martyanov, A.A.; Balabin, F.A.; Dunster, J.L.; Panteleev, M.A.; Gibbins, J.M.; Sveshnikova, A.N. Control of Platelet CLEC-2-Mediated Activation by Receptor Clustering and Tyrosine Kinase Signaling. *Biophys. J.* 2020, 118, 2641–2655, doi:10.1016/j.bpj.2020.04.023.
5. Shakhidzhanov, S.S.; Shaturny, V.I.; Panteleev, M.A.; Sveshnikova, A.N. Modulation and Pre-Amplification of PAR1 Signaling by ADP Acting via the P2Y12 Receptor during Platelet Subpopulation Formation. *Biochim. Biophys. Acta* 2015, 1850, 2518–2529, doi:10.1016/j.bbagen.2015.09.013.
6. Protasov, E.; Koleva, L.; Bovt, E.; Ataulakhanov, F.I.; Sinauridze, E. Theoretical Analysis of the Built-in Metabolic Pathway Effect on the Metabolism of Erythrocyte-Bioreactors That Neutralize Ammonium. *Metabolites* 2021, 11, doi:10.3390/metabo11010036.
7. Zaitsev, A. V; Martinov, M. V; Vitvitsky, V.M.; Ataulakhanov, F.I. Rat Liver Folate Metabolism Can Provide an Independent Functioning of Associated Metabolic Pathways. *Sci. Rep.* 2019, 9, 7657, doi:10.1038/s41598-019-44009-5.
8. Berndt, N.; Holzhütter, H.-G. Mathematical Modeling of Cellular Metabolism. Recent results cancer Res. *Fortschritte der Krebsforsch. Prog. dans les Rech. sur le cancer* 2016, 207, 221–232, doi:10.1007/978-3-319-42118-6_10.
9. Fussenegger, M.; Bailey, J.E.; Varner, J. A Mathematical Model of Caspase Function in Apoptosis. *Nat. Biotechnol.* 2000, 18, 768–774, doi:10.1038/77589.
10. Schleich, K.; Lavrik, I.N. Mathematical Modeling of Apoptosis. *Cell Commun. Signal.* 2013, 11, 44, doi:10.1186/1478-811X-11-44.
11. Panteleev, M.A.; Ovanesov, M. V; Kireev, D.A.; Shibeko, A.M.; Sinauridze, E.I.; Ananyeva, N.M.; Butylin, A.A.; Saenko, E.L.; Ataulakhanov, F.I. Spatial Propagation and Localization of Blood Coagulation Are Regulated by Intrinsic and Protein C Pathways, Respectively. *Biophys. J.* 2006, 90, 1489–1500, doi:10.1529/biophysj.105.069062.
12. Kovalenko, T.A.; Panteleev, M.A.; Sveshnikova, A.N. Different Modeling Approaches in the Simulation of Extrinsic Coagulation Factor X Activation: Limitations and Areas of Applicability. *Int. j. numer. method. biomed. eng.* 2023, 39, e3689, doi:10.1002/cnm.3689.
13. Link, K.G.; Stobb, M.T.; Sorrells, M.G.; Bortot, M.; Ruegg, K.; Manco-Johnson, M.J.; Di Paola, J.A.; Sindi, S.S.; Fogelson, A.L.; Leiderman, K.; et al. A Mathematical Model of Coagulation under Flow Identifies Factor V as a Modifier of Thrombin Generation in Hemophilia A. *J. Thromb. Haemost.* 2020, 18, 306–317, doi:10.1111/jth.14653.
14. Madrigal, J.; Monroe, D.M.; Sindi, S.S.; Leiderman, K. Modeling the Distribution of Enzymes on Lipid Vesicles: A Novel Framework for Surface-Mediated Reactions in Coagulation. *Math. Biosci.* 2024, 374, 109229, doi:https://doi.org/10.1016/j.mbs.2024.109229.
15. Bansal, L.; Nichols, E.-M.; Howsmon, D.P.; Neisen, J.; Bessant, C.M.; Cunningham, F.; Petit-Frere, S.; Ludbrook, S.; Damian, V. Mathematical Modeling of Complement Pathway Dynamics for Target Validation and Selection of Drug Modalities for Complement Therapies. *Front. Pharmacol.* 2022, 13, 855743, doi:10.3389/fphar.2022.855743.
16. Kaneva, V.N.; Dunster, J.L.; Volpert, V.; Ataulakhanov, F.; Panteleev, M.A.; Nechipurenko, D.Y. Modeling Thrombus Shell: Linking Adhesion Receptor Properties and Macroscopic Dynamics. *Biophys. J.* 2021, 120, 334–351, doi:10.1016/j.bpj.2020.10.049.
17. Bershady, E.S.; Ermokhin, D.A.; Kurattsev, V.A.; Panteleev, M.A.; Nechipurenko, D.Y. Force Balance Ratio Is a Robust Predictor of Arterial Thrombus Stability. *Biophys. J.* 2024, 123, 464–477, doi:10.1016/j.bpj.2024.01.009.
18. Kovalenko, T.A.; Giraud, M.-N.; Eckly, A.; Ribba, A.-S.; Proamer, F.; Fraboulet, S.; Podoplelova, N.A.; Valentin, J.; Panteleev, M.A.; Gonelle-Gispert, C.; et al. Asymmetrical Forces Dictate the Distribution and Morphology of Platelets in Blood Clots. *Cells* 2021, 10, doi:10.3390/cells10030584.
19. Mori, D.; Yano, K.; Tsubota, K.; Ishikawa, T.; Wada, S.; Yamaguchi, T. Computational Study on Effect of Red Blood Cells on Primary Thrombus Formation. *Thromb. Res.* 2008, 123, 114–121, doi:10.1016/j.thromres.2008.03.006.
20. Pancaldi, F.; Kim, O. V; Weisel, J.W.; Alber, M.; Xu, Z. Computational Biomechanical Modeling of Fibrin Networks and Platelet-Fiber Network Interactions. *Curr. Opin. Biomed. Eng.* 2022, 22, 100369, doi:https://doi.org/10.1016/j.cobme.2022.100369.
21. Kliuchnikov, E.; Peshkova, A.D.; Vo, M.Q.; Marx, K.A.; Litvinov, R.I.; Weisel, J.W.; Purohit, P.K.; Barsegov, V. Exploring Effects of Platelet Contractility on the Kinetics, Thermodynamics,

- and Mechanisms of Fibrin Clot Contraction. *npj Biol. Phys. Mech.* 2025, 2, 6, doi:10.1038/s44341-025-00011-9.
22. Michael, C.; Pancaldi, F.; Britton, S.; Kim, O. V.; Peshkova, A.D.; Vo, K.; Xu, Z.; Litvinov, R.I.; Weisel, J.W.; Alber, M. Combined Computational Modeling and Experimental Study of the Biomechanical Mechanisms of Platelet-Driven Contraction of Fibrin Clots. *Commun. Biol.* 2023, 6, 869, doi:10.1038/s42003-023-05240-z.
 23. Filkova, A.A.; Martyanov, A.A.; Garzon Dasgupta, A.K.; Panteleev, M.A.; Sveshnikova, A.N. Quantitative Dynamics of Reversible Platelet Aggregation: Mathematical Modelling and Experiments. *Sci. Rep.* 2019, 9, 6217, doi:10.1038/s41598-019-42701-0.
 24. Garzon Dasgupta, A.K.; Martyanov, A.A.; Filkova, A.A.; Panteleev, M.A.; Sveshnikova, A.N. Development of a Simple Kinetic Mathematical Model of Aggregation of Particles or Clustering of Receptors. *Life (Basel, Switzerland)* 2020, 10, doi:10.3390/life10060097.
 25. Firooz, S.; Kaessmair, S.; Zaburdaev, V.; Javili, A.; Steinmann, P. On Continuum Modeling of Cell Aggregation Phenomena. *J. Mech. Phys. Solids* 2022, 167, 105004, doi:https://doi.org/10.1016/j.jmps.2022.105004.
 26. Korobkin, J.-J.D.; Deordieva, E.A.; Tesakov, I.P.; Adamanskaya, E.-I.A.; Boldova, A.E.; Boldyreva, A.A.; Galkina, S. V.; Lazutova, D.P.; Martyanov, A.A.; Pustovalov, V.A.; et al. Dissecting Thrombus-Directed Chemotaxis and Random Movement in Neutrophil near-Thrombus Motion in Flow Chambers. *BMC Biol.* 2024, 22, 115, doi:10.1186/s12915-024-01912-2.
 27. Gaziano, P.; Marino, M. A Phase-Field Model of Cell Motility in Biodegradable Hydrogel Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Comput. Mech.* 2024, 74, 45–66, doi:10.1007/s00466-023-02422-8.
 28. Zakharov, P.; Gudimchuk, N.; Voevodin, V.; Tikhonravov, A.; Ataulakhanov, F.I.; Grishchuk, E.L. Molecular and Mechanical Causes of Microtubule Catastrophe and Aging. *Biophys. J.* 2015, 109, 2574–2591, doi:10.1016/j.bpj.2015.10.048.
 29. Hasan, M.R.; Alsaiari, A.A.; Fakhurji, B.Z.; Molla, M.H.R.; Asseri, A.H.; Sumon, M.A.A.; Park, M.N.; Ahammad, F.; Kim, B. Application of Mathematical Modeling and Computational Tools in the Modern Drug Design and Development Process. *Molecules* 2022, 27, doi:10.3390/molecules27134169.
 30. Kondic, A.; Bottino, D.; Harrold, J.; Kearns, J.D.; Musante, C.J.; Odinecs, A.; Ramanujan, S.; Selimkhanov, J.; Schoeberl, B. Navigating Between Right, Wrong, and Relevant: The Use of Mathematical Modeling in Preclinical Decision Making. *Front. Pharmacol.* 2022, Volume 13-2022.