

## Малый практикум по биофизике

### Раздел: математическое моделирование биологических процессов

#### Задача 1. Модель внутриклеточных колебаний кальция

##### Введение.

Для биологических систем характерно периодическое изменение различных характеристик. Период этих колебаний может быть связан с периодическими изменениями условий жизни на Земле — смена времен года, смена дня и ночи. Существуют и другие геофизические ритмы — солнечные, лунные, связанные с периодами атмосферных явлений. Но многие периодические процессы имеют частоту изменения, не связанную очевидным образом с внешними геокосмическими циклами. Это так называемые «биологические часы» различной природы, начиная от биомакромолекул, биохимических колебаний, вплоть до популяционных волн.

С некоторыми из типов периодических движений вы уже имели дело при рассмотрении особых точек типа центр и нарастающих или затухающих колебаний в случае устойчивого или неустойчивого фокуса.

*Вспомните!*

*Что такое особая точка? Какие еще типы есть? Как качественно исследовать систему дифференциальных уравнений?*

Однако, «биологические часы» имеют свойство, отличающее их от рассмотренных типов колебаний: неизменность во времени периода и амплитуды таких колебаний, означающих стационарность и устойчивость колебательного режима.

В данном случае периодическое изменение величин представляет собой один из типов стационарного поведения системы. Если колебания в системе имеют постоянные период и амплитуду, устанавливаются независимо от начальных условий и поддерживаются благодаря свойствам самой системы, а не вследствие воздействия периодической силы, система называется автоколебательной. В фазовом пространстве такому типу поведения соответствует предельный цикл.

*Вспомните!*

*Чем отличается предельный цикл от центра?*

*Каковы условия возникновения предельного цикла?*

История признания существования автоколебательных процессов в биологии и химии, как и история признания всего нового, поистине драматична.

Ещё в середине 50х годов XX столетия мысль о возможности существования колебательных биохимических процессов казалась довольно странной.

Что значит «концентрация веществ меняется периодически»? Это означает, что также периодически меняется скорость реакции!

Это было совершенно не понятно, особенно учитывая факт, что рассматривались все процессы в предположении о термодинамическом равновесии процесса. И действительно, пока система равновесна, ни о каких колебательных процессах не может идти речи. Идея, что при неравновесном протекании реакции, когда есть постоянный приток субстрата и/или энергии в систему, могут возникнуть принципиально иные режимы, почему-то долго искала дорогу к признанию. И поэтому, открытие Б.П. Белоусовым периодической реакции окисления броматом малоновой (лимонной) кислоты в присутствии серной кислоты было встречено не просто с недоверием, а с

резким отрицанием. Примерно такая же была первая реакция на первые статьи И. Р. Пригожина по неравновесной термодинамике.

Вопрос о подчинении законам термодинамики процессов, протекающих в живых объектах, ставился еще Больцманом. Ответ на него появился только в середине XX столетия — безусловно подчиняются! Но для них требуется постоянный приток вещества и энергии, т.е. эти процессы принципиально неравновесны. Значит, нельзя подходить к ним с мерками равновесной термодинамики. До полного понимания тонкостей неравновесных процессов еще очень далеко! В настоящее время мы научились неплохо описывать только процессы, происходящие в окрестности состояния равновесия.

Когда ломались копыта в области биохимии и термодинамики, в математике уже были разработаны методы, позволяющие исследовать колебательные процессы. Более того, принципиально была показана возможность существования автоколебательных процессов, также были сформулированы (математические) требования, которым должны удовлетворять такие системы. Огромный вклад в разработку математической теории колебаний внесли в нее представители математической французской школы (Анри Пуанкаре, Альфред Лотка) и русской (прежде всего это физики и математики под руководством Александра Александровича Андропова и Леонида Исааковича Мандельштама).

*Вспомните!*

*Как определяется состояние равновесия в термодинамике? Какое состояние мы называем динамическим равновесием? Как соотносится понятие особой точки и состояния динамического равновесия?*

Далее Давидом Альбертовичем Франк-Каменецким и его тогда еще аспирантом И.Е. Сальниковым были описаны процессы, происходящие в реакторах, где также наблюдались колебательные режимы.

А с конца 50х годов того же XX столетия в печати начали появляться статьи, описывающие автоколебательные процессы, наблюдаемые в биологических системах, в основном из области биохимии и популяционной экологии.

Одна из первых работ, посвященных колебательным явлениям, принадлежит америкаскому биохимику Бриттену Чансу. Он исследовал процесс гликолиза. Как известно, процесс гликолиза проходит в несколько стадий. Колебания реагентов обнаружены в центральной стадии (превращение фруктозо-6-фосфата во фруктозо-1,6-бисфосфат), катализируемой ферментом фосфофруктокиназой.

Как известно, в процессе гликолиза происходит синтез АТФ. Следовательно, в ходе реакции должны наблюдаться колебания в синтезе АТФ. Колебания, наблюдающиеся в ходе этой реакции, имеют период около минуты.

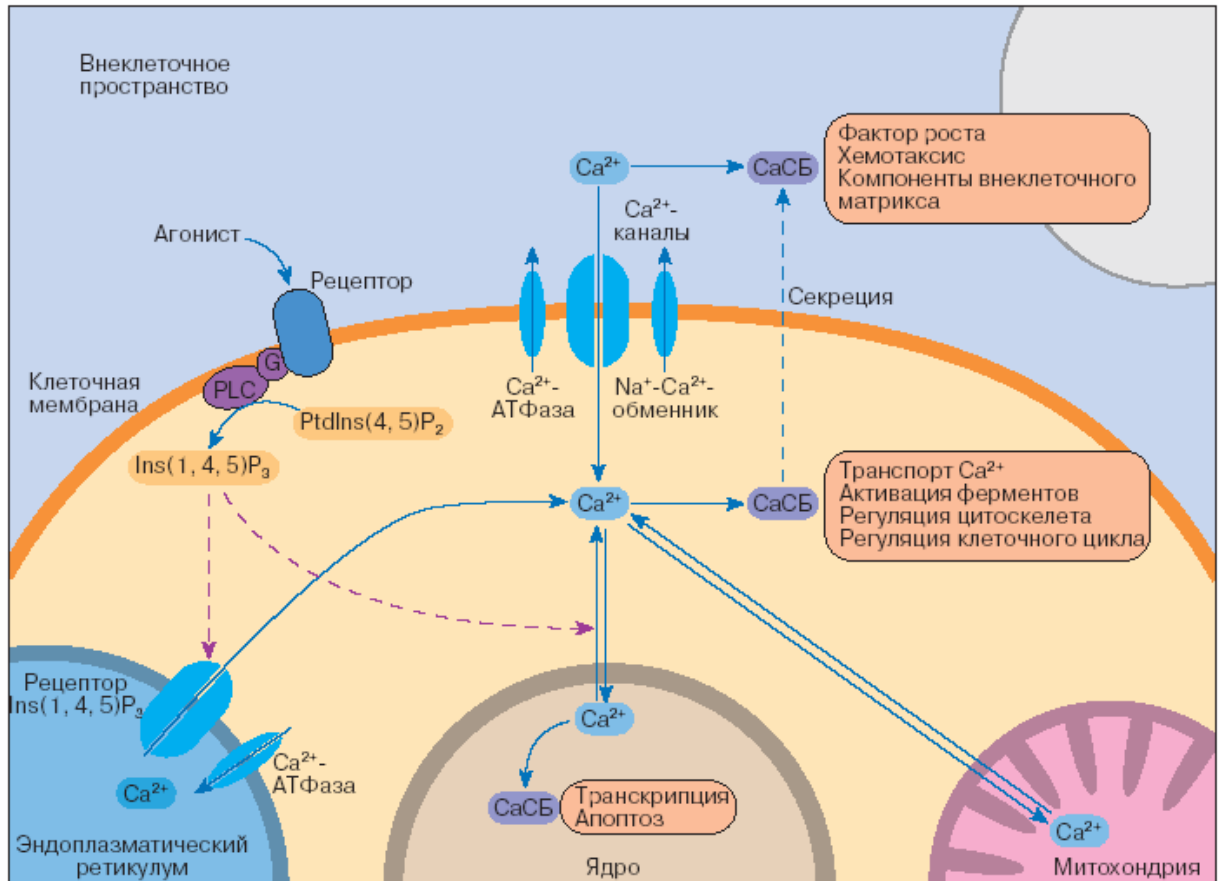
Далее было обнаружено колебания в различных процессах, связанных с синтезом и гидролизом АТФ. Были найдены колебательные процессы в митохондриях, в процессах, связанных с сигнальными процессами, прежде всего связанными с кальцием.

В цитоплазме клеток концентрация ионов кальция составляет примерно 50 – 100 нМ, в межклеточном пространстве примерно 3 мМ. Таким образом, разница в концентрациях составляет примерно четыре порядка. Поддерживается такая разница с помощью группы ферментов, носящих название кальциевых АТФаз (Са-АТФаза). Ферменты, входящие в эту группу различаются по строению, по локализации и по способу регуляции. Но все эти ферменты переносят ионы кальция из цитоплазмы либо во внеклеточное пространство, либо во внутриклеточное депо — пузырьки эндоплазматического ретикулума за счет энергии гидролиза АТФ.

Как показали исследования последних 30 лет, клетка тратит огромное количество энергии и пластического материала для поддержания низкой концентрации ионов кальция. Показано, что процесс выбрасывания ионов кальция в цитоплазму и понижение

концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  используется клетками в огромном количестве случаев. Прежде всего ионы кальция являются универсальными внутриклеточными регуляторами — они передают поступающие в клетку сигналы к ферментативным системам.

В покоей клетке концентрация регулятора низка. В ответ на поступивший сигнал в клетке происходит лавинообразное увеличение концентрации регулятора. Значит, должны существовать системы, быстро понижающие концентрацию веществ — регуляторов до исходного уровня.



**Рис. 1.** Участие Ca-связывающих белков в передаче внутри- и внеклеточных сигналов. Использованные сокращения: Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, инозитол 1,4,5-трифосфат; PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, фосфатидилинозитол 4,5-дифосфат; PLC, фосфолипаза C; G, GTP-связывающие белки; CaCB, Ca-связывающие белки (по [2] с изменениями)

Одним из таких веществ — регуляторов, как уже говорилось, является кальций. Почему? Ответ на этот вопрос, видимо, надо искать в эволюционной истории формирования клеток. Высказывается предположение, что первоначально, клетка пыталась избавиться от ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , образующих плохо растворимые комплексы с фосфатами, ставшими основными «носителями» энергии в клетке.

Клетке были необходимы системы, контролирующие концентрацию кальция в цитоплазме и быстро понижающие их концентрацию (выводящие систему). Такие системы в клетке встроены в мембраны. На наружной мембране располагаются Ca-АТФазы, выкачивающие  $\text{Ca}^{2+}$  против градиента из клетки в межклеточную среду.

Там же располагается еще одна система, понижающая концентрацию кальция в цитоплазме —  $\text{Ca}^{2+}$  –  $\text{Na}^+$  обменник, который обменивает внутриклеточный  $\text{Ca}^{2+}$  на внеклеточный  $\text{Na}^+$ .

На мембранах эндоплазматического ретикулума расположена Ca-Атфаза, которая за счет гидролиза АТФ откачивает  $\text{Ca}^{2+}$  из цитоплазмы в цистерны эндоплазматического ретикулума. Кроме того, в митохондриях также находится специальная транспортная система, откачивающая кальций из цитоплазмы в матрикс.

Позднее, на основе системы, выводящей ионы кальция из клетки и контролирующей их концентрацию внутри клетки, появились кальций-зависимые сигнальные системы.

В настоящее время известно, что на поверхности клетки располагаются рецепторы, способные специфически взаимодействовать с гормонами. При связывании гормона с рецептором может происходить открывание специальных каналов, по которым из межклеточного пространства в клетку входит  $\text{Ca}^{2+}$ . Другие гормоны, взаимодействуя с рецепторами, активируют фермент фосфолипазу С, которая осуществляет гидролиз мембранного фосфолипида (фосфотидилинозитол-4,5-фосфата). При этом образуется инозитол 1,4,5-трифосфат ( $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ,  $\text{IP}_3$ ).  $\text{IP}_3$  связывается с рецептором на мембране эндоплазматического ретикулула, открывая специальные каналы, через которые  $\text{Ca}^{2+}$  выходит из цистерн в цитоплазму. Повышение  $\text{Ca}^{2+}$  внутри клетки оказывается своеобразным сигналом тревоги. В ответ на повышение концентрации ионов кальция клетка мобилизует все свои системы, удаляющие кальций. Таким образом, концентрация кальция в клетке происходит только на короткий период, что и дает возможность передачи стимула.

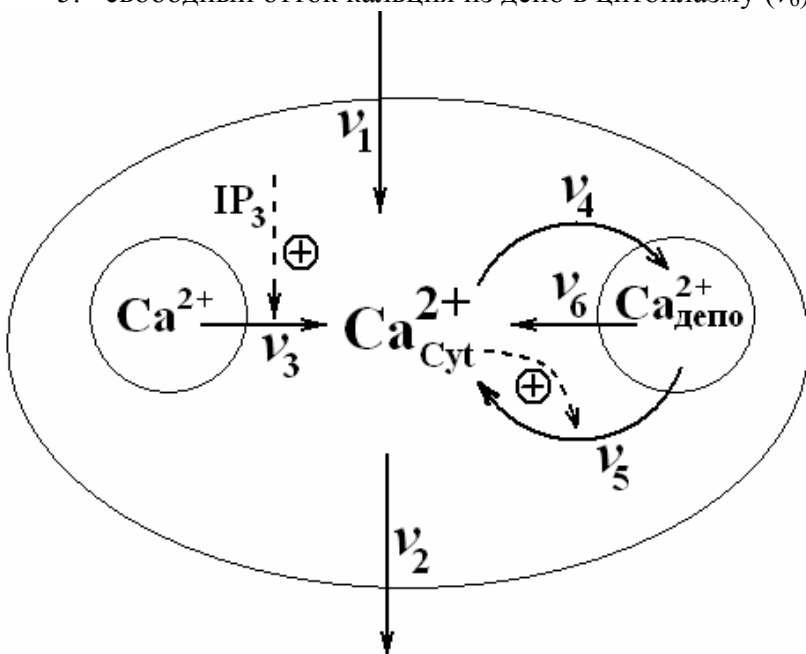
Описанная выше схема передачи сигнала с помощью ионов кальция, лежит в основе многих систем, и прежде всего в основе мышечного сокращения. Сокращение мышцы начинается с того, что в ответ на сигнал, пришедший от нейрона к клетке, начинается с выхода  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулула и его взаимодействия с сократительными белками. Последующее удаление  $\text{Ca}^{2+}$  приводит к расслаблению мышцы.

*Анализу именно такой схемы посвящена первая задача практикума.*

*Прежде всего, выделим главные моменты в схеме процесса.*

Рассматривается следующая схема и модель процессов.

1. Приток и отток цитозольного кальция через плазматическую мембрану со скоростями  $v_1$  и  $v_2$ .
2. Гормонально активируемое высвобождение кальция из внутриклеточного пула, чувствительного к гормону (инозитол-три-фосфат  $\text{IP}_3$ ) ( $v_3$ ).
3. Активный транспорт цитозольного кальция в гормон-не-чувствительный пул – депо ( $v_4$ ).
4. Высвобождение кальция из депо, которое активируется цитоплазматическим кальцием ( $v_5$ ).
5. свободный отток кальция из депо в цитоплазму ( $v_6$ ).



Переменные величины — концентрации кальция в цитоплазме ( $S_1$ ) и в гормон-не-чувствительном депо ( $S_2$ ).

Модель состоит из двух дифференциальных уравнений:

$$\frac{dS_1}{dt} = v_1 - v_2 + v_3 - v_4 + v_5 + v_6,$$

$$\frac{dS_2}{dt} = v_4 - v_5 - v_6.$$

Скорости потоков  $v_1$  и  $v_3$  предполагаются постоянными. В дальнейшем сумма  $v_1 + v_3$  будет объединена в один **параметр**  $v_0$ . Остальные скорости — функции от концентраций. (переписать систему с  $v_0$ )

Разумно считать, что скорости  $v_2$  и  $v_4$  двух  $\text{Ca}^{2+}$ /АТФ-зависимых насосов активируются цитозольным кальцием (т.е. зависят от концентрации  $S_1$ ), в то время как они не зависят от концентрации запасенного кальция  $S_2$ . С математической точки зрения это означает, что:

$$\begin{aligned} \frac{\partial v_2}{\partial S_1} > 0, \quad \frac{\partial v_4}{\partial S_1} > 0, \\ \frac{\partial v_2}{\partial S_2} = 0, \quad \frac{\partial v_4}{\partial S_2} = 0. \end{aligned} \quad (2)$$

Для скорости утечки  $v_6$  можно считать, что

$$\frac{\partial v_6}{\partial S_1} = 0, \quad \frac{\partial v_6}{\partial S_2} > 0. \quad (3)$$

Вполне возможно, что это процесс обратимый, однако формально свободное поступление кальция в гормон-не-чувствительный пул можно учесть в потоке  $v_4$ .

Исследуем систему двух дифференциальных уравнений в общем виде, не детализируя зависимости скоростей  $v_i$  от концентраций  $S_1$  и  $S_2$ .

$$\text{В стационарном состоянии} \quad \begin{cases} v_4 = v_5 + v_6, \\ v_2 = v_1 + v_3. \end{cases}$$

Тип особой точки определяем исходя из коэффициентов линеаризованной системы:

$$\begin{bmatrix} \frac{\partial P}{\partial S_1} & \frac{\partial P}{\partial S_2} \\ \frac{\partial Q}{\partial S_1} & \frac{\partial Q}{\partial S_2} \end{bmatrix}, \text{ где } P \text{ и } Q \text{ — правые части уравнений системы (1).}$$

С учетом соотношений (2) и (3) получаем:

$$\frac{\partial P}{\partial S_1} = -\frac{\partial v_2}{\partial S_1} - \frac{\partial v_4}{\partial S_1} + \frac{\partial v_5}{\partial S_1},$$

$$\frac{\partial P}{\partial S_2} = \frac{\partial v_5}{\partial S_2} + \frac{\partial v_6}{\partial S_2},$$

$$\frac{\partial Q}{\partial S_1} = \frac{\partial v_4}{\partial S_1} - \frac{\partial v_5}{\partial S_1},$$

$$\frac{\partial Q}{\partial S_2} = -\frac{\partial v_5}{\partial S_2} - \frac{\partial v_6}{\partial S_2}.$$

Таким образом,

$$\sigma = -\left( \frac{\partial v_2}{\partial S_1} + \frac{\partial v_4}{\partial S_1} + \frac{\partial v_5}{\partial S_2} + \frac{\partial v_6}{\partial S_2} \right) + \frac{\partial v_5}{\partial S_1},$$

$$\Delta = \frac{\partial v_2}{\partial S_1} \left( \frac{\partial v_5}{\partial S_2} + \frac{\partial v_6}{\partial S_2} \right).$$

Поскольку нас интересуют ситуация, когда в системе имеют место автоколебания (т.е. существует предельный цикл), выпишем необходимые условия  $\Delta > 0$  и  $\sigma$  меняет знак.

Поскольку в наших предположениях  $\frac{\partial v_2}{\partial S_1} > 0$ , то необходимым условием бифуркации

Хопфа является неравенство:  $\frac{\partial v_5}{\partial S_2} + \frac{\partial v_6}{\partial S_2} > 0$ . Далее, для того, чтобы  $\sigma$  меняла знак,

необходимо выполнение неравенства  $\frac{\partial v_5}{\partial S_1} > 0$ . Это соотношение имеет чрезвычайно

важный смысл: оно означает, что в рассматриваемой схеме активация высвобождения кальция из гормон-не-чувствительного пула цитозольным кальцием (наличие положительной обратной связи) — это необходимое условие существования автоколебаний концентраций кальция.

Теперь проведем исследование, учитывая зависимости скоростей потоков кальция от концентраций. Скорости  $v_2$ ,  $v_4$ ,  $v_6$  считаются пропорциональными концентрациям цитозольного кальция и кальция гормон-не-чувствительного пула:

$$v_2 = k_2 S_1,$$

$$v_4 = k_4 S_1,$$

$$v_6 = k_6 S_2.$$

Для скорости  $v_5$  принимается следующая зависимость (так называемое уравнение Хилла):

$$v_5 = \frac{k_5 S_2 S_1^{nH}}{K_{0.5}^{nH} + S_1^{nH}}.$$

Здесь  $K_{0.5}$  — константа полунасыщения (подробно о ней будет рассказано на следующей задаче),  $nH$  — коэффициент Хилла.

Итак, стационарное состояние системы (1) имеет вид:

$$\bar{S}_1 = \frac{v_1 + v_3}{k_2} = \frac{v_0}{k_2},$$

$$\bar{S}_2 = \frac{v_0 k_4}{k_2} \left( k_6 + \frac{k_5 v_0^{nH}}{v_0^{nH} + (k_2 K_{0.5})^{nH}} \right)^{-1}.$$

В этом состоянии величина  $\Delta$  всегда является положительной. Границы области параметров устойчивости, на которой имеет место бифуркация Хопфа, вычисляется из уравнения  $\sigma = 0$ .