

# МАТЕМАТИЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ БІОХІМІЧНИХ ПРОЦЕСІВ

УДК 576.342:576.314:577.352.4:577.353

## МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КИНЕТИКИ ТРАНСМЕМБРАННОГО ПЕРЕНОСА КАЛЬЦИЯ В ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ

П. Ф. ЖУК, С. А. КАРАХИМ, В. Ф. ГОРЧЕВ, С. А. КОСТЕРИН

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;  
e-mail: laserlab@biochem.kiev.ua; kinet@biochem.kiev.ua

*Создана и исследована математическая модель, описывающая кинетику трансмембранного переноса кальция в гладкомышечной клетке, в основу которой положено представление о том, что изменение концентрации катионов кальция внутри клетки обусловлено двумя взаимно противоположными процессами: увеличением пропускной способности кальциевых каналов плазматической мембраны под воздействием сигнального вещества и удалением кальция из внутриклеточного пространства  $Mg^{2+}$ , АТР-зависимым кальциевым насосом, локализованным в плазматической мембране. Принципиальным отличием предложенной модели от моделей, рассмотренных в литературе ранее, является то, что после ферментативного превращения сигнального вещества клеточная система возвращается в исходное стационарное состояние. Результаты расчетов показали, что эта модель достаточно точно описывает известные экспериментальные данные кинетики трансмембранного переноса кальция. В работе подробно изучено влияние различных факторов (константы Михаэлиса и предельной скорости работы кальциевого насоса, исходных концентраций сигнального вещества и фермента, катализирующего его превращение, констант скоростей реакций) на кинетику переноса кальция через плазматическую мембрану.*

*Ключевые слова: математическая модель, гладкомышечная клетка, плазматическая мембрана, трансмембранный перенос кальция, кальциевый канал, рецептор, внутриклеточный кальций, кальциевый насос, константа Михаэлиса, медиатор.*

Гладкомышечная клетка представляет собой сложную открытую электромеханохимическую систему. Методология изучения функциональной активности миоцитов имеет комплексный характер, причем, наряду с традиционными экспериментальными методами, весьма распространенным является метод математического моделирования [1, 2]. Численные эксперименты над математической моделью позволяют проанализировать возможные биохимические и биофизические механизмы исследуемых процессов и описать их динамические характеристики, что трудно (а, иногда, и невозможно) осуществить традиционными экспериментальными методами.

Одной из наиболее важных областей исследований, направленных на выяснение биохимических и биофизических закономерностей сопряжения возбуждения и сокращения глад-

кой мышцы, является изучение молекулярных и мембранных механизмов регулирования концентрации  $Ca^{2+}$  в миоплазме.

Проблема регуляции внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  имеет, несомненно, комплексный характер. Действительно, такая регуляция является следствием так называемого “концертного” эффекта, обеспечиваемого согласованным в пространстве и во времени функционированием систем пассивного и активного транспорта данного катиона, локализованных в различных субклеточных мембранных структурах (плазматическая мембрана, саркоплазматический ретикулум, митохондрии). Указанный эффект, для которого характерно наличие положительных и отрицательных обратных связей (например,  $Ca^{2+}$  – и потенциалзависимая инактивация кальциевых каналов, кальций-индуцируемый выброс  $Ca^{2+}$

из ретикулаума и т.д.), характеризуется нелинейностью и кооперативностью [3–9].

Несмотря на то, что общие представления о закономерностях внутриклеточного кальциевого обмена в целом разработаны, конкретные механизмы взаимодействия внутриклеточных структур, задействованных в процессах повышения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме и его откачке во внеклеточное пространство, пока недостаточно ясны. Можно, как минимум, выделить три основных блока проблем, связанных с кальциевым гомеостазом в гладкомышечной клетке (см. [3, 4, 6, 9–11]):

1. Роль плазматической мембраны в переносе  $\text{Ca}^{2+}$  (в частности, важными являются вопросы о влиянии межфазного потенциала, сигнального вещества и внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  на пропускную способность кальциевых каналов плазматической мембраны, зависимость скорости откачки указанного катиона из клетки через плазматическую мембрану от кинетических параметров  $\text{Mg}^{2+}$ , АТФ-зависимого кальциевого насоса и величины межфазового потенциала);

2. Роль внутриклеточных мембранных структур (саркоплазматического ретикулаума и митохондрий) во внутриклеточном кальциевом гомеостазе (речь идет о механизме и временных характеристиках процессов закачивания  $\text{Ca}^{2+}$  в ретикулум и выброса этого катиона во внутриклеточное пространство; емкостных параметрах ретикулаума и митохондрий);

3. Механизм, непосредственно обеспечивающий сопряжение динамики внутриклеточного кальциевого обмена с мышечным сокращением.

Сложность указанных выше проблем приводит к необходимости построения иерархии последовательно дополняющихся и уточняющихся математических моделей [12]. Предметом данной работы являлись проблемы первого блока; по существу, речь идет о математическом моделировании закономерностей транссарколеммного обмена ионов кальция в гладкой мышце. Нами моделировался процесс накопления  $\text{Ca}^{2+}$  внутри идеализированной гладкомышечной клетки за счет усиления пропускной способности кальциевых каналов плазматической мембраны под воздействием сигнального вещества, а также процесс откачки  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточного пространства  $\text{Mg}^{2+}$ , АТФ-зависимым кальциевым насосом, локализованным в плазматической мембране (без учета влияния внутриклеточных мембранных структур).

### Математическая модель

При построении математической модели переноса  $\text{Ca}^{2+}$  через плазматическую мембрану учитывались такие известные факты [3, 4, 7, 8, 10, 11, 13]:

1. гладкомышечная клетка занимает объем  $V$  и окружена плазматической мембраной с площадью  $S$ , на которой присутствует постоянное (равное  $S \cdot [R]_{all}$ ) число кальциевых каналов (где  $[R]_{all}$  – поверхностная концентрация кальциевых каналов на мембране, т.е. число кальциевых каналов на единице площади мембраны клетки);

2. в стационарном состоянии клетки поток  $\text{Ca}^{2+}$  внутрь клетки через кальциевые каналы (пассивный транспорт ионов кальция в клетку по градиенту концентраций) компенсируется его откачкой из внутриклеточного пространства  $\text{Mg}^{2+}$ , АТФ-зависимым кальциевым насосом;

3. сигнальное вещество  $A$  взаимодействует с рецептором  $R$  кальциевого канала на внешней поверхности мембраны, в результате чего каналы открываются, увеличивая свою пропускную способность;

4. открытые кальциевые каналы могут закрываться вследствие блокировки внутриклеточным кальцием (“ $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая инактивация”);

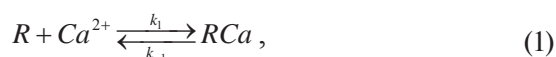
5. открытые кальциевые каналы обладают пропускной способностью существенно большей, чем закрытые;

6. сигнальное вещество подвергается ферментативному превращению, в результате чего его концентрация постепенно снижается, что приводит к уменьшению количества связанного с рецепторами сигнального вещества, а соответственно и к уменьшению пропускной способности кальциевых каналов;

7.  $\text{Mg}^{2+}$ , АТФ-зависимый кальциевый насос плазматической мембраны функционирует постоянно, выкачивая  $\text{Ca}^{2+}$  из клетки во внеклеточное пространство со скоростью, зависящей от концентрации внутриклеточного кальция.

Опишем сначала стационарное (базальное) состояние клетки. Известно, что кальциевые каналы имеют на внутренней стороне плазматической мембраны центры связывания ионов кальция. Когда каналы открываются, в клетку начинают поступать ионы кальция. В дальнейшем, вследствие увеличения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , он связывается с этими центрами, вызывая закрытие каналов. Мы полагаем, что ионы кальция в клетке взаимодействуют с та-

кими центрами кальциевых каналов независимо от того, открыты каналы или нет. В стационарном состоянии (в отсутствие сигнального вещества) кальциевые каналы находятся в закрытом состоянии  $R$  (пропуская ионы кальция с незначительной скоростью), но мы полагаем, что ионы кальция, находящиеся внутри клетки (с концентрацией 100 нМ в стационарном состоянии), способны взаимодействовать с центрами связывания кальциевых каналов на внутренней стороне мембраны, образуя комплекс  $RCa$  (при этом каналы остаются закрытыми и их поверхностная концентрация в стационарном режиме составляет  $[RCa]_o$ ):



и, независимо от того, в каком состоянии находится канал ( $R$  или  $RCa$ ), он обладает фиксированной (незначительной) пропускной способностью, которая характеризуется коэффициентом  $D$ . Поток кальция из внеклеточной среды в миоплазму определяется законом Фика

$$J_1 = D[R]_{all}([Ca^{2+}]_e - [Ca^{2+}]_o), \quad (2)$$

где  $[R]_{all}$  — поверхностная концентрация кальциевых каналов на мембране (т.е. число кальциевых каналов на единице площади мембраны клетки);  $[Ca^{2+}]_e$ ,  $[Ca^{2+}]_o$  — концентрации ионов кальция соответственно во внеклеточном пространстве и в клетке (базальная концентрация). Из предположения стационарности следует, что точно такой же по величине, но обратный по направлению, поток  $Ca^{2+}$  через мембрану из миоплазмы во внеклеточное пространство создается  $Mg^{2+}$ , АТФ-зависимым кальциевым насосом сарколеммы, кинетический режим работы которого описывается уравнением Михаэлиса–Ментен:

$$J_2 = -\frac{V_{max}[Ca^{2+}]_o V}{(K_m + [Ca^{2+}]_o)S}, \quad (3)$$

где  $V_{max}$  — предельная скорость функционирования этой транспортной системы (“число оборотов” кальциевого насоса, тестируемое в режиме насыщения ее субстратом переноса),  $K_m$  — константа Михаэлиса относительно ионов кальция (показатель “сродства”  $Ca^{2+}$  к транспортной системе). Таким образом, получаем первое равновесное уравнение:

$$D[R]_{all}([Ca^{2+}]_e - [Ca^{2+}]_o) = \frac{V_{max}[Ca^{2+}]_o V}{(K_m + [Ca^{2+}]_o)S}. \quad (4)$$

Второе равновесное уравнение вытекает из равновесного состояния реакции (1):

$$k_1[R]_o[Ca^{2+}]_o = k_{-1}[RCa]_o, \quad (5)$$

Поскольку  $[R]_o + [RCa]_o = [R]_{all}$ , то из уравнения (5) находим выражения для базальных поверхностных концентраций кальциевых каналов на мембране в состояниях  $R$  и  $RCa$ :

$$\begin{aligned} [R]_o &= \frac{k_{-1}[R]_{all}}{k_{-1} + k_1[Ca^{2+}]_o}, \\ [RCa]_o &= \frac{k_1[R]_{all}[Ca^{2+}]_o}{k_{-1} + k_1[Ca^{2+}]_o}. \end{aligned} \quad (6)$$

Следовательно, математической моделью стационарного состояния клетки являются уравнения (4) и (6).

Для описания нестационарных процессов в клетке предположим, что отклонение от состояния равновесия возникает в результате подачи во внеклеточное пространство (объем которого, приходящийся на одну клетку, принимаем равным объему клетки, т.е.  $V$ ) сигнального вещества (медиатора)  $A$ , которое взаимодействует с рецепторами кальциевых каналов, расположенных на внешней стороне мембраны, образуя комплексы



причем константы скоростей реакций не зависят от состояния канала ( $R$  или  $RCa$ ). Кроме того, медиатор взаимодействует с некоторым ферментом  $F$ , образуя фермент-субстратный комплекс  $AF$ :



который, в свою очередь, распадается с регенерацией фермента  $F$  и продукта реакции  $P$



что и приводит к постепенному практически полному исчезновению сигнального вещества вне клетки.

Предполагаем, что кальциевые каналы в состояниях  $R$ ,  $RCa$  или  $ARCa$  (т.е. закрытые каналы) имеют одинаковую пропускную способность ( $D$ ), тогда как пропускная способность кальциевого канала в состоянии  $AR$  (т.е. открытого канала) существенно выше ( $\mu D$ ); т.е., медиатор усиливает пропускную способность кальциевого канала, не связанного с  $Ca^{2+}$ , в  $\mu$  раз.

Реакции (1), (7)–(9) представляют химическую сторону нестационарного процесса.

Запишем кинетические уравнения этих реакций [14].

$$\frac{d[R]}{dt} = k_{-1}[RCa] - k_1[R][Ca^{2+}] + k_2[AR] - k_3[A][R] + k_{-2}[AR] - k_2[A][R], \quad (10)$$

$$\frac{d[RCa]}{dt} = k_1[R][Ca^{2+}] - k_{-1}[RCa] + k_2[ARCa] - k_2[A][RCa], \quad (11)$$

$$\frac{d[AR]}{dt} = k_2[A][R] - k_{-2}[AR], \quad (12)$$

$$\frac{d[ARCa]}{dt} = k_2[A][RCa] - k_{-2}[ARCa], \quad (13)$$

$$\frac{d[A]}{dt} = \frac{S}{V} \{k_{-2}([AR] + [ARCa]) - k_2[A]([R] + [RCa]) + [RCa]\} + k_{-3}[AF] - k_3[A][F], \quad (14)$$

$$\frac{d[AF]}{dt} = k_3[A][F] - (k_{-3} + k_4)[AF], \quad (15)$$

$$\frac{d[F]}{dt} = (k_{-3} + k_4)[AF] - k_3[A][F], \quad (16)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_4[AF]. \quad (17)$$

Для составления дифференциального уравнения изменения концентрации  $Ca^{2+}$  внутри клетки модифицируем выражения (2) и (3) для потоков ионов кальция через мембрану

$$J_1 = D([R]_{all} + (\mu - 1)[AR])([Ca^{2+}]_e - [Ca^{2+}]),$$

$$J_2 = -\frac{V_{max}[Ca^{2+}]V}{(K_m + [Ca^{2+}])S}. \quad (18)$$

Кроме этого, учтем изменение концентрации  $Ca^{2+}$  в цитоплазме за счет реакции (1). Скорость изменения массы  $m(t)$  ионов кальция в клетке задается тогда выражением:

$$\frac{dm}{dt} = S(J_1 + J_2 + k_{-1}[RCa] - k_1[R][Ca^{2+}]). \quad (19)$$

Из (18), (19), получаем дифференциальное уравнение для расчета внутриклеточной концентрации кальция

$$\frac{d[Ca^{2+}]}{dt} = \frac{S}{V} \{D([R]_{all} + (\mu - 1)[AR])([Ca^{2+}]_e - [Ca^{2+}]) + k_{-1}[RCa] - k_1[R][Ca^{2+}]\} -$$

$$-\frac{V_{max}[Ca^{2+}]}{K_m + [Ca^{2+}]}. \quad (20)$$

Таким образом, математическая модель нестационарного транссарколеммного обмена  $Ca^{2+}$ , вызванного медиаторным веществом  $A$ , представляет собой задачу Коши для системы обыкновенных дифференциальных уравнений (10)–(17), (20). Начальные условия определяются начальными концентрациями веществ:  $[R]|_{t=0} = [R]_0$ ,  $[RCa]|_{t=0} = [RCa]_0$ ,  $[AR]|_{t=0} = 0$ ,  $[ARCa]|_{t=0} = 0$ ,  $[A]|_{t=0} = [A]_0$ ,  $[AF]|_{t=0} = 0$ ,  $[F]|_{t=0} = [F]_0$ ,  $[P]|_{t=0} = 0$ ,  $[Ca^{2+}]|_{t=0} = [Ca^{2+}]_0$ , где базальные поверхностные концентрации  $[R]_0$  и  $[RCa]_0$  кальциевых каналов на мембране определяются по уравнениям (6).

Отметим, что кинетические параметры клетки  $D$ ,  $[R]_{all}$ ,  $[Ca^{2+}]_e$ ,  $[Ca^{2+}]_0$ ,  $V_{max}$ ,  $K_m$  — не являются произвольными величинами, а связаны между собой соотношением (4). Поэтому, задавая, например, значения  $[R]_{all}$ ,  $[Ca^{2+}]_e$ ,  $[Ca^{2+}]_0$ ,  $V_{max}$ ,  $K_m$ , мы однозначно определяем коэффициент пропускной способности кальциевых каналов  $D$ .

Математические модели стационарного и нестационарного состояний клетки также связаны между собой, поскольку после окончания процесса трансмембранного переноса  $Ca^{2+}$ , индуцированного импульсом сигнального вещества, клеточная система вновь приходит в то же стационарное состояние, в котором она находилась до начала процесса. В стационарном состоянии клетка может находиться как угодно долго без видимых изменений макроскопических параметров, в частности, размеров клетки.

Возвращаемость клеточной системы в то же состояние, в котором она находилась до начала процесса, является существенным отличием модели (10)–(17), (20) от моделей, рассмотренных ранее в литературе [1, 2, 10, 12], поскольку в последних изучаемые клеточные системы, после окончания процесса трансмембранного переноса  $Ca^{2+}$ , переходили в состояние, отличное от исходного, что противоречит свойствам стационарного состояния.

Кроме того, в представленной модели отображен реальный механизм индуцирования (инициации) процесса трансмембранного переноса  $Ca^{2+}$  посредством сигнального вещества  $A$ , которое претерпевает ферментативное превращение. Такой подход позволяет естественным путем начать процесс переноса  $Ca^{2+}$  через плазматическую мембрану и, в то же время, ограничить длительность воздействия сигнального вещества на этот процесс.



### Результаты и обсуждение

При исследовании математической модели (10)–(17), (20) и проведении расчетов нестационарного транссарколемного обмена  $\text{Ca}^{2+}$ , вызванного медиаторным веществом  $A$ , использовались представленные ниже значения параметров системы:  $[\text{Ca}^{2+}]_i = 1 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ ;  $[\text{Ca}^{2+}]_o = 1 \cdot 10^{-7} \text{ М}$ ;  $k_1 = 1 \cdot 10^9 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ ;  $k_{-1} = 3 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$ ;  $V = 4 \cdot 10^{-12} \text{ дм}^3$ ;  $S = 8 \cdot 10^{-7} \text{ дм}^2$ ;  $k_2 = 5 \cdot 10^8 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ ;  $k_{-2} = 3 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$ ;  $[A]_n = 1 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ ;  $[F]_n = 2 \cdot 10^{-8} \text{ М}$ ;  $k_3 = 2 \cdot 10^8 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ ;  $k_{-3} = 3 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$ ;  $V_{max} = 2 \cdot 10^{-7} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$ ;  $K_m = 1 \cdot 10^{-7} \text{ М}$ ;  $k_4 = 1 \cdot 10^2 \text{ с}^{-1}$ ;  $[R]_{all} = 1 \cdot 10^{-11} \text{ моль/дм}^2$ ;  $\mu = 10$ .

Значения концентраций катионов кальция во внеклеточном  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  и внутриклеточном  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  пространствах в равновесном состоянии, объем клетки  $V$  и площадь ее поверхности  $S$  соответствуют значениям, приведенным в [3, 8], а величины максимальной скорости  $V_{max}$  и константы Михаэлиса  $K_m$  для кальциевого насоса варьировали в пределах, исследованных в статье [10]. Коэффициент усиления пропускной способности кальциевого канала  $\mu$  нами был принят равным 10. Остальные параметры системы (концентрация сигнального вещества  $[A]_n$  и фермента  $[F]_n$ , который осуществляет его каталитическое превращение, концентрация каналов на поверхности мембраны  $[R]_{all}$  и константы скоростей отдельных стадий ферментативной реакции) подбирались в соответствии с положениями, изложенными в [10]. При данных параметрах в отсутствие сигнального вещества в системе устанавливается стационарное состояние, для которого из соотношений (4) и (6) мы можем рассчитать коэффициент пропускной способности кальциевых каналов  $D = 50,005 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ ,  $[R]_o = 9,967 \cdot 10^{-12} \text{ моль/дм}^2$ ,  $[RCa]_o = 3,32 \cdot 10^{-14} \text{ моль/дм}^2$ , а также величины потоков  $\text{Ca}^{2+}$  через плазматическую мембрану внутрь клетки и из клетки наружу (в стационарном состоянии они равны  $5,0 \cdot 10^{-13} \text{ моль/дм}^2 \cdot \text{с}$ ). Из приведенных данных видно, что в стационарном состоянии (при заданных параметрах) только 0,33% каналов оказываются связанными с ионами кальция с внутренней стороны плазматической мембраны.

Благодаря математическому моделированию мы можем детально изучать процесс, исследуя такие зависимости, которые порой невозможно получить экспериментально, но которые позволяют нам лучше представлять картину происходящего. Из данных, приведенных на рис. 1 можно понять, как протекает процесс переноса  $\text{Ca}^{2+}$  через плазматическую

мембрану. В частности, мы можем видеть, как изменяется концентрация сигнального вещества  $A$  (кривая 4) под действием фермента  $F$  и как при этом изменяется количество открытых каналов (кривая 5). Несмотря на то, что в рассматриваемой модели количество молекул сигнального вещества во внеклеточном пространстве в 5 раз превышает количество каналов (а соответственно и рецепторов) на плазматической мембране, а также огромное значение константы скорости взаимодействия молекул сигнального вещества с рецепторами, при данных параметрах сигнальное вещество открывает всего около 16% каналов (в максимуме). При этом максимальная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  внутри клетки наблюдается через 8,75 с, когда более половины сигнального вещества  $A$  уже разрушилось ферментом  $F$ . В момент открытия максимального количества каналов наблюдается и максимальный поток ионов кальция внутрь клетки  $J_i$  (кривая 2). При выбранных параметрах это происходит очень быстро – приблизительно через 0,0002 с после начала процесса. В точке максимума поток  $J_i$  становится приблизительно в 2,2 раза более мощным, чем в стационарном состоянии. В дальнейшем поток ионов кальция внутрь клетки начинает постепенно уменьшаться, в то время, как поток ионов кальция из клетки

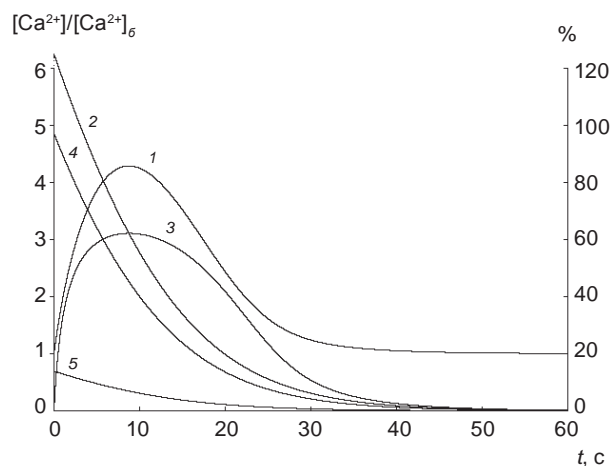


Рис. 1. Кинетика трансмембранного переноса кальция. Изменение во времени концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  по сравнению с базальным уровнем  $[\text{Ca}^{2+}]_i/[\text{Ca}^{2+}]_o$  (кривая 1), сигнального вещества  $A$  (кривая 4, в процентах к начальной концентрации), количества открытых каналов (кривая 5, в процентах к общему количеству), а также потоков ионов кальция внутрь клетки и из клетки (кривые 2 и 3 соответственно, в процентах к базальному уровню)

$J_2$ , вызиваемый кальциевым насосом, продолжает нарастать (кривая 3). Однако концентрация  $Ca^{2+}$  внутри клетки (кривая 1) при этом продолжает увеличиваться, а максимальная его концентрация внутри клетки достигается только тогда, когда потоки внутрь клетки и из клетки становятся равны по величине  $J_1 = J_2$  (в этот момент больше половины открытых каналов уже оказываются закрытыми). В этой точке поток  $J_2$  достигает своего максимального значения, которое приблизительно в 1,6 раза превышает стационарный уровень, а концентрация ионов кальция внутри клетки увеличивается примерно в 4,3 раза по сравнению со стационарным уровнем. Далее наблюдается уменьшение потока из клетки  $J_2$  и продолжается уменьшение потока в клетку  $J_1$ , однако первый по величине превосходит второй. В результате происходит выкачка ионов кальция из клетки. Когда оба потока становятся равны, наступает новое стационарное состояние, которое точно соответствует исходному. Отметим также, что из того количества каналов, которые были открыты при помощи сигнального вещества, в момент открытия максимального количества каналов оказываются заблокированными катионами кальция с внутренней стороны мембраны 0,33%. В тот момент, когда концентрация  $Ca^{2+}$  внутри клетки становится максимальной, это количество достигает 1,41%.

Теперь, используя предложенную математическую модель, рассмотрим влияние наибо-

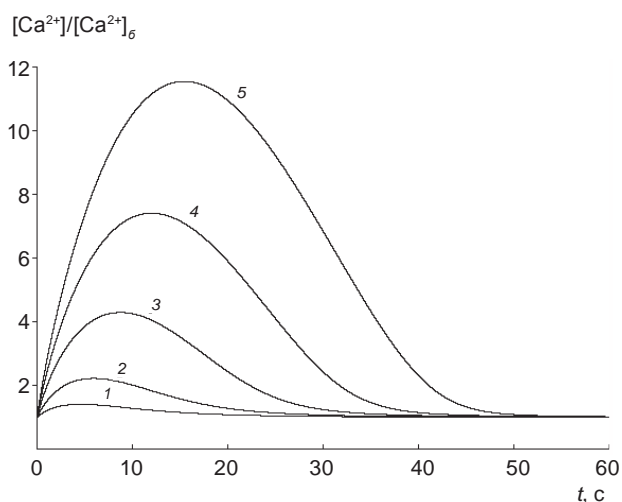


Рис. 2. Влияние различных концентраций сигнального вещества  $A$  на накопление  $Ca^{2+}$  внутри клетки (по сравнению с базальным уровнем). Исходная концентрация сигнального вещества  $[A]_n$  составляла: 1 – 2 мкМ; 2 – 5 мкМ; 3 – 10 мкМ; 4 – 15 мкМ; 5 – 20 мкМ

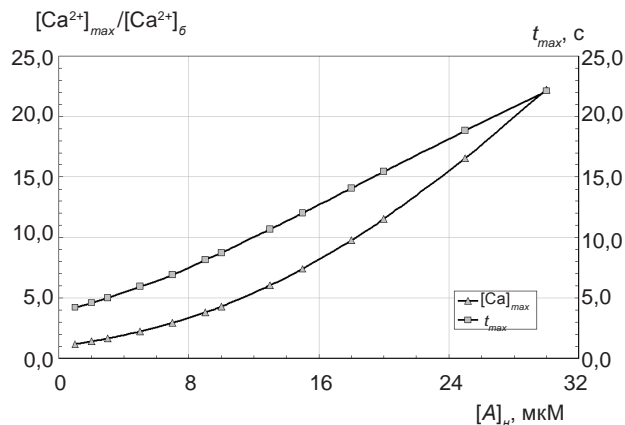


Рис. 3. Максимальный уровень внутриклеточного  $Ca^{2+}$  по сравнению с базальным уровнем ( $[Ca^{2+}]_{max}/[Ca^{2+}]_0$ ) и время ( $t_{max}$ ), за которое достигается максимальная концентрация внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , как функции начальной концентрации сигнального вещества  $[A]_n$

лее важных параметров исследуемого процесса на кинетику переноса  $Ca^{2+}$  через плазматическую мембрану.

При увеличении начальной концентрации сигнального вещества  $A$ , как и следовало ожидать, увеличивается максимальный уровень концентрации внутриклеточного кальция  $[Ca^{2+}]_{max}$ , а также время, за которое этот максимальный уровень достигается  $t_{max}$  (рис. 2). При этом при высоких концентрациях сигнального вещества как  $t_{max}$ , так и  $[Ca^{2+}]_{max}$  увеличиваются почти линейно с ростом концентрации  $A$ , а при низких концентрациях линейность несколько нарушается (рис. 3). Такой характер изменения внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  можно объяснить тем, что взятое в больших концентрациях сигнальное вещество открывает большее количество каналов и на более протяженный период времени. В результате этого в клетку попадает больше  $Ca^{2+}$  и кальциевый насос начинает работать более эффективно, выкачивая  $Ca^{2+}$  из клетки (что видно по возрастающему наклону правого плеча графика с ростом концентрации сигнального вещества), однако, для выкачивания все большего количества  $Ca^{2+}$  необходимо все больше времени. Поэтому и максимальный уровень концентрации внутриклеточного кальция, и время, за которое этот максимальный уровень достигается, увеличиваются пропорционально увеличению концентрации сигнального вещества.

С увеличением концентрации фермента  $F$ , который осуществляет каталитическое превращение сигнального вещества  $A$ , концентрация

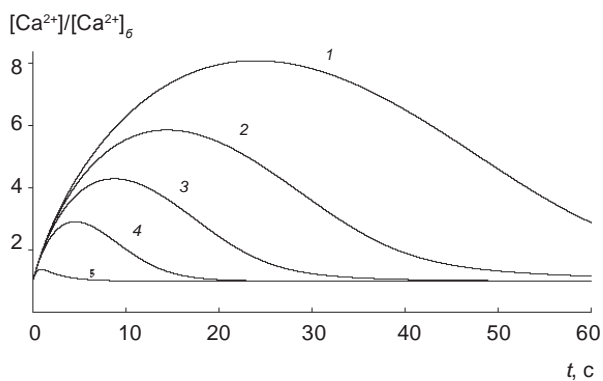


Рис. 4. Влияние фермента  $F$ , катализирующего превращение сигнального вещества, на накопление  $Ca^{2+}$  внутри клетки (по сравнению с базальным уровнем). Исходная концентрация фермента  $[F]_0$  составляла: 1 – 5 нМ; 2 – 10 нМ; 3 – 20 нМ; 4 – 50 нМ; 5 – 500 нМ

сигнального вещества снижается быстрее, что приводит к более быстрому уменьшению количества открытых каналов, к уменьшению максимальной концентрации внутриклеточного кальция и к уменьшению времени достижения этой максимальной концентрации (рис. 4). При этом, в отличие от предыдущего случая, зависимость обоих последних параметров от концентрации фермента очень нелинейная. При больших концентрациях фермента максимальный уровень концентрации внутриклеточного кальция и время его достижения медленно уменьшаются по мере роста  $[F]_0$  (рис. 5). При малых концентрациях фермента оба парамет-

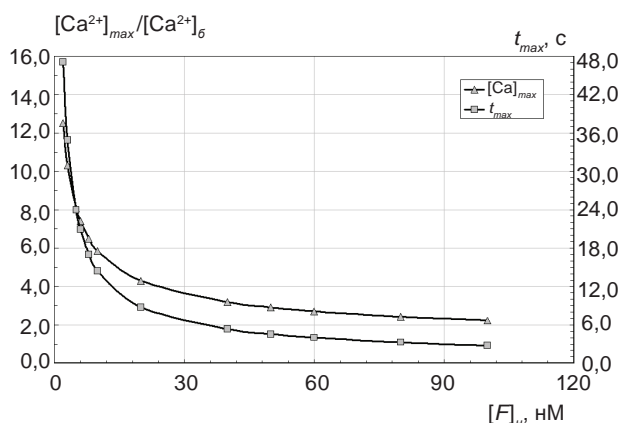


Рис. 5. Максимальный уровень внутриклеточного  $Ca^{2+}$  по сравнению с базальным уровнем ( $[Ca^{2+}]_{max}/[Ca^{2+}]_0$ ) и время ( $t_{max}$ ), за которое достигается максимальная концентрация внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , как функции начальной концентрации фермента  $[F]_0$ , катализирующего превращение сигнального вещества  $A$

ра резко возрастают при уменьшении исходной концентрации фермента. Отметим также, что при увеличении концентрации фермента  $F$ , время достижения равновесной концентрации внутриклеточного кальция уменьшается (рис. 4).

Константа скорости  $k_2$ , наряду с концентрацией сигнального вещества  $A$ , определяет количество открываемых каналов: чем больше константа, тем больше каналов откроет данное количество сигнального вещества. Поэтому с увеличением константы скорости  $k_2$  увеличивается максимальный уровень внутриклеточного кальция и время достижения этого уровня (рис. 6). Как и для концентрации сигнального вещества, максимальный уровень внутриклеточного кальция и время достижения этого уровня (рис. 7) почти линейно зависят от константы скорости  $k_2$ .

Константа скорости  $k_3$  определяет скорость связывания сигнального вещества  $A$  ферментом  $F$  с образованием комплекса  $AF$ , который в дальнейшем распадается с образованием вещества  $P$ , являющегося продуктом каталитического превращения сигнального вещества. В результате связывания понижается концентрация свободного сигнального вещества, что сказывается на количестве открытых каналов. Поэтому при увеличении константы скорости  $k_3$  уменьшается максимальный уровень внутриклеточного кальция, время достижения этого уровня и время достижения стационарного состояния (рис. 8). Влияние константы скорости  $k_3$  (рис. 9) на эти параметры очень похоже на влияние фермента  $F$  (см. рис. 5). Здесь так-

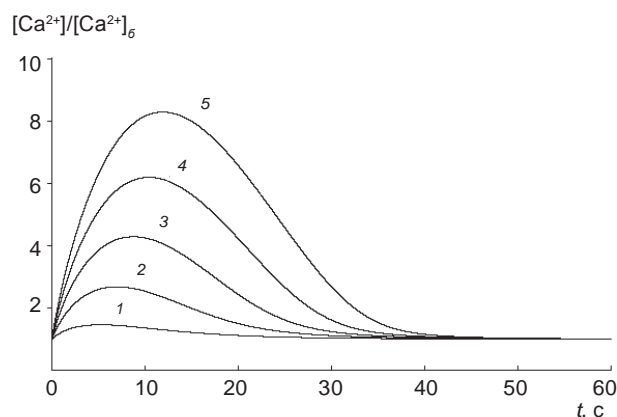


Рис. 6. Изменение концентрации внутриклеточного  $Ca^{2+}$  (по сравнению с базальным уровнем) во времени при различных значениях константы скорости  $k_2$ : 1 –  $1 \cdot 10^8 M^{-1} \cdot c^{-1}$ ; 2 –  $3 \cdot 10^8 M^{-1} \cdot c^{-1}$ ; 3 –  $5 \cdot 10^8 M^{-1} \cdot c^{-1}$ ; 4 –  $7 \cdot 10^8 M^{-1} \cdot c^{-1}$ ; 5 –  $9 \cdot 10^8 M^{-1} \cdot c^{-1}$

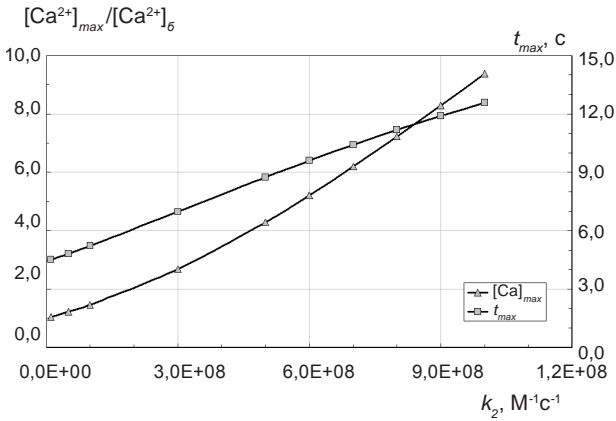


Рис. 7. Зависимость максимального уровня концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  по сравнению с базальным уровнем ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{max}}/[\text{Ca}^{2+}]_0$ ) и времени ( $t_{\text{max}}$ ), за которое достигается максимальная концентрация внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , от значений константы скорости  $k_2$

же наблюдается резкое увеличение как максимальной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , так и времени ее достижения при уменьшении  $k_3$ .

Константа скорости  $k_4$  определяет скорость распада комплекса фермента с сигнальным веществом  $AF$ , т.е. скорость превращения сигнального вещества в продукт  $P$ : чем больше константа, тем быстрее исчезает сигнальное вещество. Это приводит к тому, что с увеличением константы скорости  $k_4$  уменьшается максимальный уровень внутриклеточного кальция, время достижения этого уровня и время достижения стационарного состояния (рис. 10). Как можно видеть из рис. 11, зависимости максимального уровня внутриклеточного кальция и времени достижения этого

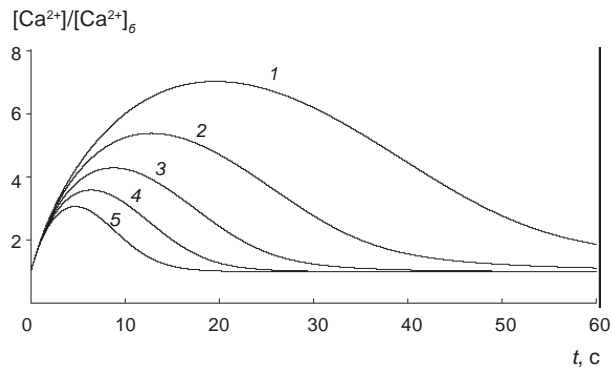


Рис. 8. Изменение концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  (по сравнению с базальным уровнем) во времени при различных значениях константы скорости  $k_3$ : 1 –  $5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ ; 2 –  $1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ ; 3 –  $2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ ; 4 –  $4 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ ; 5 –  $1 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$

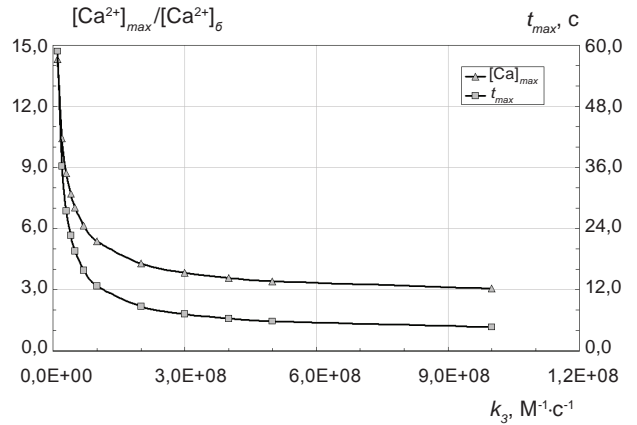


Рис. 9. Зависимость максимального уровня концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  по сравнению с базальным уровнем ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{max}}/[\text{Ca}^{2+}]_0$ ) и времени ( $t_{\text{max}}$ ), за которое достигается максимальная концентрация внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , от значений константы скорости  $k_3$

уровня от величины константы скорости  $k_4$  по виду похожи на соответствующие зависимости от константы скорости  $k_3$  (см. рис. 9).

Константа скорости  $k_1$  определяет скорость блокирования кальциевых каналов ионами кальция. Поэтому с увеличением константы скорости  $k_1$  должен уменьшаться максимальный уровень внутриклеточного кальция. Из рис. 12 видно, что так и происходит, однако, в нашем случае, при заданных исходных параметрах, существует верхний предел максимальной концентрации кальция внутри клетки – порядка  $0,45 \text{ мкМ}$  (рис. 13), поэтому уменьшение константы скорости ниже  $10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  практически не приводит к заметному изменению кинетики переноса  $\text{Ca}^{2+}$ .

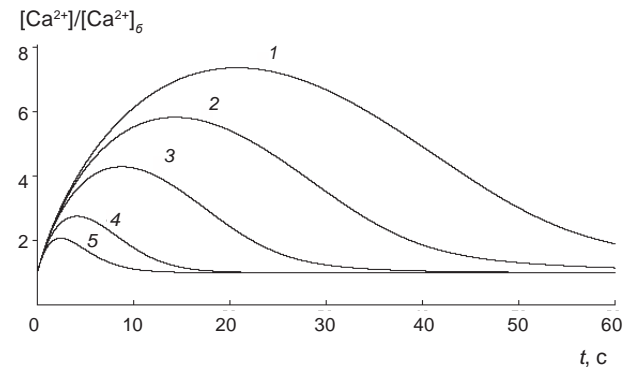


Рис. 10. Изменение концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  (по сравнению с базальным уровнем) во времени при различных значениях константы скорости  $k_4$ : 1 –  $30 \text{ c}^{-1}$ ; 2 –  $50 \text{ c}^{-1}$ ; 3 –  $100 \text{ c}^{-1}$ ; 4 –  $300 \text{ c}^{-1}$ ; 5 –  $700 \text{ c}^{-1}$



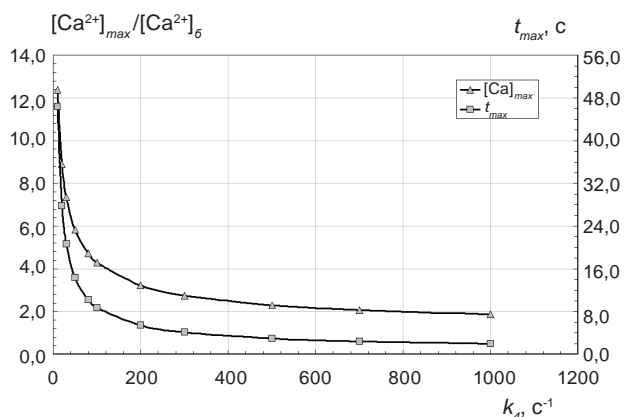


Рис. 11. Зависимость максимального уровня концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  по сравнению с базальным уровнем ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{max}}/[\text{Ca}^{2+}]_б$ ) и времени ( $t_{\text{max}}$ ), за которое достигается максимальная концентрация внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , от значений константы скорости  $k_4$

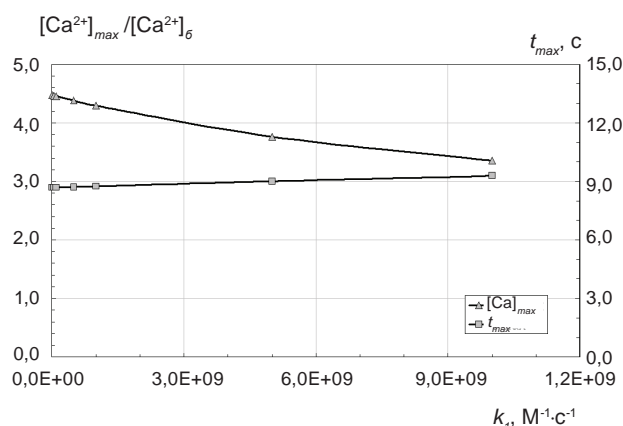


Рис. 13. Зависимость максимального уровня концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  по сравнению с базальным уровнем ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{max}}/[\text{Ca}^{2+}]_б$ ) и времени ( $t_{\text{max}}$ ), за которое достигается максимальная концентрация внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , от значений константы скорости  $k_1$

При увеличении константы скорости  $k_1$  максимальный уровень концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  линейно снижается, а время достижения этого уровня остается практически неизменным (рис. 13).

Нами также были получены зависимости концентрации внутриклеточного кальция от времени при различных режимах работы кальциевого насоса плазматической мембраны, характеризующихся величинами константы Михаэлиса и предельной скорости работы насоса.

Модель качественно правильно отражает форму временной зависимости переноса кальция в клетку. Из рис. 14 вытекает, что при увеличении константы Михаэлиса наблюдается уменьшение амплитуды кальциевого сигнала,

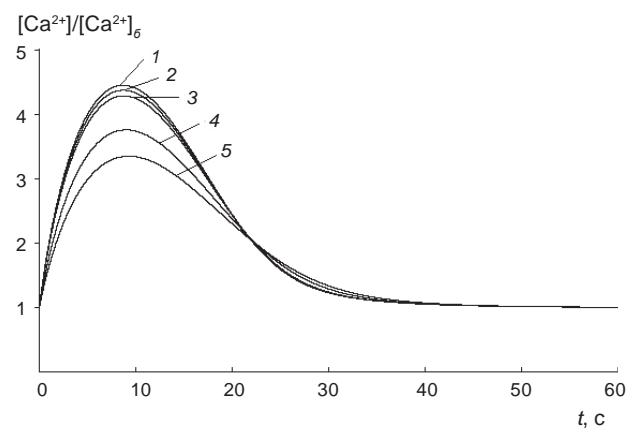


Рис. 12. Изменение концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  (по сравнению с базальным уровнем) во времени при различных значениях константы скорости  $k_1$ : 1 —  $1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ ; 2 —  $5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ ; 3 —  $1 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ ; 4 —  $5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ ; 5 —  $1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$

времени выхода на стационарный режим и времени достижения максимальной концентрации кальция внутри клетки (когда концентрация кальция внутри клетки значительно превышает стационарный уровень). При этом наблюдается характерная нелинейная зависимость указанных параметров от величины константы Михаэлиса (рис. 15). Более того, зависимость времени достижения максимальной концентрации кальция внутри клетки от величины константы Михаэлиса кальциевого насоса, в отличие от других аналогичных зависимостей, характеризуется сложным поведе-

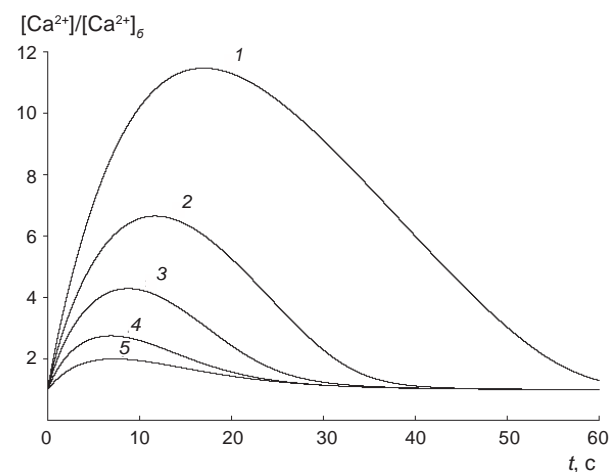


Рис. 14. Зависимость концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  (по сравнению с базальным уровнем) от времени при  $V_{\text{max}} = 0,2 \text{ мкМс}^{-1}$  и значениях константы Михаэлиса  $K_m$  кальциевого насоса: 1 —  $0,03 \text{ мкМ}$ ; 2 —  $0,06 \text{ мкМ}$ ; 3 —  $0,10 \text{ мкМ}$ ; 4 —  $0,20 \text{ мкМ}$ ; 5 —  $0,50 \text{ мкМ}$

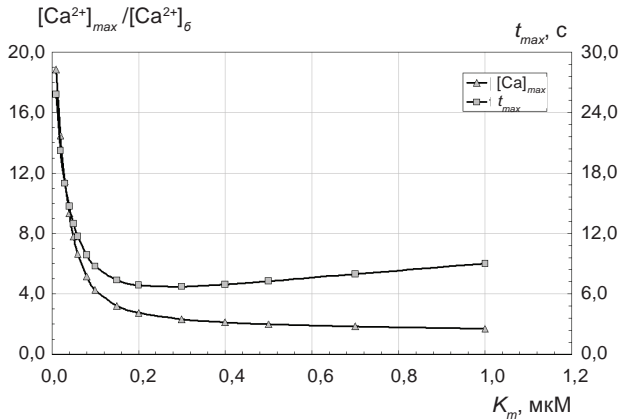


Рис. 15. Зависимость максимального уровня концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  по сравнению с базальным уровнем ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{max}}/[\text{Ca}^{2+}]_{\text{б}}$ ) и времени ( $t_{\text{max}}$ ), за которое достигается максимальная концентрация внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , от значений константы Михаэлиса  $K_m$  кальциевого насоса

нием: сначала при малых  $K_m$  время достижения максимальной концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  резко понижается, а затем, пройдя минимум при определенном значении  $K_m$ , начинает медленно возрастать при дальнейшем повышении константы Михаэлиса.

График, изображенный на рис. 16, позволяет сделать вывод, что при увеличении предельной скорости кальциевого насоса плазматической мембраны наблюдается увеличение амплитуды кальциевого сигнала и уменьше-

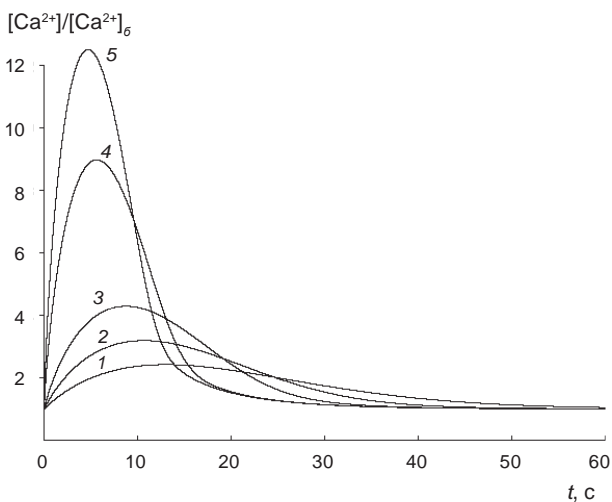


Рис. 16. Зависимость концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  (по сравнению с базальным уровнем) от времени при  $K_m = 0, 10 \mu\text{M}$  и значениях предельной скорости  $V_{\text{max}}$  кальциевого насоса: 1 –  $0,05 \mu\text{M}\cdot\text{с}^{-1}$ , 2 –  $0,10 \mu\text{M}\cdot\text{с}^{-1}$ , 3 –  $0,20 \mu\text{M}\cdot\text{с}^{-1}$ , 4 –  $1,0 \mu\text{M}\cdot\text{с}^{-1}$ , 5 –  $2,0 \mu\text{M}\cdot\text{с}^{-1}$

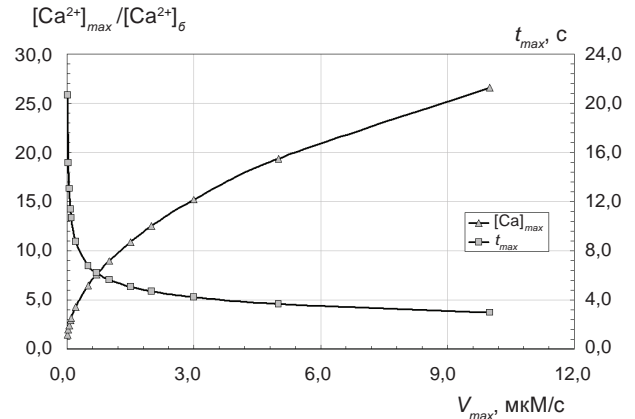


Рис. 17. Зависимость максимального уровня концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  по сравнению с базальным уровнем ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{max}}/[\text{Ca}^{2+}]_{\text{б}}$ ) и времени ( $t_{\text{max}}$ ), за которое достигается максимальная концентрация внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , от предельной скорости  $V_{\text{max}}$  кальциевого насоса

ние времени достижения максимальной концентрации кальция внутри клетки: такого поведения не наблюдается больше ни для одного из рассмотренных нами случаев. Время выхода на стационарный режим, в отличие от предыдущего случая, уменьшается при увеличении предельной скорости. При этом скорость изменения концентрации внутриклеточного кальция увеличивается с увеличением  $V_{\text{max}}$ . Из рис. 17 видно, что при уменьшении  $V_{\text{max}}$  амплитуда кальциевого сигнала резко снижается, а время достижения максимума кальциевого сигнала еще более резко возрастает.

Отметим, что учет возврата клеточной системы в исходное стационарное состояние, в котором она находилась до начала процесса, приводит к изменению порядка расположения графиков зависимостей концентрации внутриклеточного кальция от времени при увеличении константы Михаэлиса и предельной скорости кальциевого насоса по сравнению с приведенными в статье [10]. Действительно, производительность кальциевого насоса должна быть жестко привязана к скорости пассивного транспорта. В противном случае будет нарушено соотношение концентраций кальция вне и внутри клетки в стационарном состоянии. Другими словами, если производительность кальциевого насоса уменьшится (при неизменной скорости пассивного транспорта), то внутриклеточная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  может стать значительно больше базального уровня, а если увеличится – то насос выкачает из клетки практически все катионы кальция. Взаимосвязь скорости пропускания кальциевых ка-

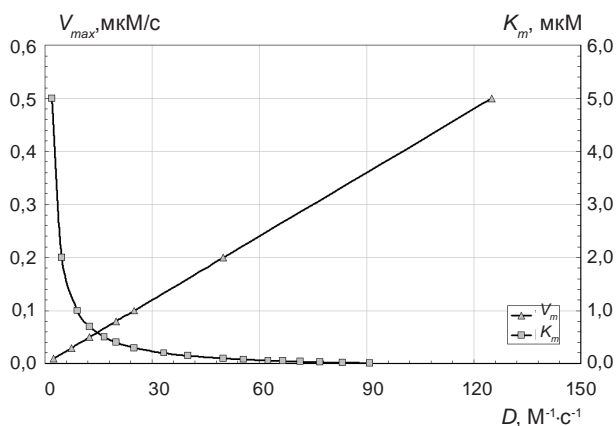


Рис. 18. Взаимосвязь пропускной способности каналов  $D$  и кинетических параметров кальциевого насоса  $V_{max}$  и  $K_m$

налов и кинетических параметров кальциевого насоса означает то, что производительность кальциевого насоса должна соответствовать скорости поступления кальция в клетку через кальциевые каналы для того, чтобы в клетке концентрация  $Ca^{2+}$  в стационарном состоянии поддерживалась на уровне 100 нМ при уровне кальция вне клетки 1 мМ. Расчеты показывают, что скорость пропускания кальциевых каналов линейно зависит от предельной скорости кальциевого насоса и резко снижается с увеличением константы Михаэлиса кальциевого насоса (рис. 18).

Анализ приведенных выше зависимостей показывает, что разработанная модель адекватно реагирует на изменение параметров. Модель устойчиво работает в широком интервале изменений параметров, что позволяет брать ее за основу при разработке моделей для описания трансмембранного переноса  $Ca^{2+}$  не только в гладкомышечных клетках различных органов, но также и в клетках поперечно-полосатых мышц.

Вышеприведенные модельные представления, касающиеся анализа закономерностей внутриклеточного кальциевого обмена в гладкой мышце на основании рассмотрения роли плазматической мембраны миоцитов, конечно же, не в полной мере отражают реальный механизм накопления кальция в клетке, поскольку не охватывают всю совокупность мембранных механизмов, задействованных в контроле внутриклеточного кальциевого гомеостаза. Дальнейшее развитие этих представлений тре-

бует учета роли внутриклеточных мембранных структур – саркоплазматического ретикулума и митохондрий – в контроле внутриклеточных кальциевых транзиентов. Это будет предметом наших дальнейших исследований.

### МАТЕМАТИЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ КІНЕТИКИ ТРАНСМЕМБРАННОГО ПЕРЕНЕСЕННЯ КАЛЬЦІЮ У КЛІТИНАХ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ

П. Ф. Жук, С. О. Карахим, В. Ф. Горчев, С. О. Костерин

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна  
НАН України, Київ;  
e-mail: laserlab@biochem.kiev.ua;  
kinet@biochem.kiev.ua

Створена і досліджена математична модель, що описує кінетику трансмембранного перенесення кальцію у клітині гладенького м'яза, яка базується на уявленнях про те, що зміна концентрації катіонів кальцію всередині клітини обумовлена двома взаємно протилежними процесами: збільшенням пропускної спроможності кальцієвих каналів плазматичної мембрани під впливом сигнальної речовини й видаленням кальцію із внутрішньоклітинного простору  $Mg^{2+}$ , АТР-залежною кальцієвою помпою, локалізованою у плазматичній мембрані. Принциповою відмінністю запропонованої моделі від моделей, розглянутих у літературі раніше, є те, що після ферментативного перетворення сигнальної речовини клітинна система повертається до вихідного стаціонарного стану. Результати розрахунків показали, що ця модель досить точно описує відомі експериментальні дані кінетики трансмембранного перенесення кальцію. У роботі докладно вивчено вплив різних факторів (константи Михаеліса та граничної швидкості роботи кальцієвої помпи, початкових концентрацій сигнальної речовини й ферменту, що каталізує її перетворення, констант швидкостей реакцій) на кінетику транспортування кальцію через плазматичну мембрану.

Ключові слова: математична модель, гладеньком'язова клітина, плазматична мембрана, трансмембранне перенесення кальцію, кальцієвий канал, рецептор, внутрішньоклітинний кальцій, кальцієва помпа, константа Михаеліса, медіатор.

**MATHEMATICAL SIMULATION  
OF TRANSMEMBRANE CALCIUM  
TRANSPORT KINETICS IN SMOOTH  
MUSCLE CELLS**

*P. F. Zhuk, S. O. Karakhim, V. F. Gorchev,  
S. O. Kosterin*

Palladin Institute of Biochemistry, National  
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: laserlab@biochem.kiev.ua;  
kinet@biochem.kiev.ua

**S u m m a r y**

A mathematical model, which describes kinetics of transmembrane calcium transport in a smooth muscular cell, has been elaborated and investigated taking into account that the change of calcium cations concentration within a cell is determined by two mutually opposite processes: an increase of a carrying capacity of calcium channels of plasma membrane under signal substance action and calcium removal from the intracellular space by  $Mg^{2+}$ , ATP-dependent calcium pump localized on the plasma membrane. The fundamental difference of the proposed model against the models analyzed in literature before is that the cellular system returns to the initial stationary state after enzyme-catalysed transformation of the signal substance. The results of calculations showed that this model really described the experimental kinetics of the transmembrane calcium transport. In this paper the influence of different parameters (Michaelis constant and ultimate rate of calcium pump, initial concentrations of signal substance and enzyme decomposing it, rate constants) on kinetics of calcium transport through the plasma membrane has been investigated in detail.

**Key words:** mathematical model, smooth muscular cell, plasma membrane, transmembrane calcium transport, calcium channel, receptor, intracellular calcium, calcium pump, Michaelis constant, mediator.

1. *Волькенштейн М. В.* // Успехи физ. наук. — 1970. — **100**, № 4. — С. 681–717.
2. *Дещеревский В. И.* Математические модели мышечного сокращения. — М.: Наука, 1977. — 160 с.
3. *Костерин С. А.* Транспорт кальция в гладких мышцах. — К.: Наукова думка, 1990. — 216 с.
4. *Геннис Р.* Биомембраны: Молекулярная структура и функции. — М.: Мир, 1997. — 624 с.
5. *Гусев Н. Б.* // Соросовский образовательный журнал. — 1998. — № 5. — С. 2–9.
6. *Рубцов А. М.* // Там же. — 2000. — № 9. — С. 17–24.
7. *Зинченко В. П., Долгачева Л. П.* Внутриклеточная сигнализация. Пушино: Электронное издательство «Аналитическая микроскопия» (<http://cam.psn.ru>), 2003.
8. *Самойлов В. О.* Медицинская биохимия. — Санкт-Петербург: Спецлитература, 2004. — 495 с.
9. *Костюк П. Г., Костюк О. П., Лук'янець О. С.* Іони кальцію у функції мозку — від фізіології до патології. — Київ: Наукова думка, 2005. — 199 с.
10. *Костерин С. О., Мірошниченко М. С., Давидовська Т. Л. та ін.* // Укр. біохім. журн. — 2001. — **73**, № 6. — С. 138–142.
11. *Ткачук В. А.* // Соросовский образовательный журнал. — 2001. — **7**, № 1. — С. 10–15.
12. *Маслій І., Санагурський Д.* // Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна. — 2002. — Вип. 31. — С. 16–21.
13. *Филипьев М. П.* Электронно-конформационные модели кальций-высвобождающей системы клеток сердечной мышцы. Автореферат дис. ... к. ф.-м. наук. — Екатеринбург: Уральский государственный университет им. А.М. Горького, 2007. — 24 с.
14. *Fundamentals of Enzyme Kinetics / Revised edition by Athel Cornish-Bowden.* Third reprint. — Portland Press — London, 2002. — 344 p.

Получено 08.01.2008