

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии
Российской академии наук»

На правах рукописи

КОРОБКИНА Юлия Джессика Дмитриевна

Подвижность нейтрофилов вблизи растущего тромба *ex vivo*

1.5.2. Биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор физико-математических наук
А.Н. Свешникова

Москва – 2025

Оглавление

Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы.....	12
1.1. Тромбовоспаление.....	12
1.1.2. Тромбоциты.....	12
1.1.3. Нейтрофилы.....	12
1.1.4. Взаимодействие нейтрофилов и тромбоцитов при тромбовоспалении	13
1.1.5. Этапы рекрутирования нейтрофилов к растущему тромбу: роллинг, адгезия, хемотаксис.....	14
1.2. Подвижность эукариотических клеток.....	15
1.2.1. Типы подвижности эукариотических клеток.....	15
1.2.2. Перестройка цитоскелета при движении нейтрофила.....	18
1.2.3. Полимеризация актинового цитоскелета при подвижности нейтрофилов	19
1.2.4. Хемотаксис нейтрофилов и актиновый цитоскелет.....	20
1.2.5. Нарушения хемотаксиса нейтрофилов при аутоиммунных заболеваниях	21
1.3. Регуляция подвижности клеток ионами кальция.....	22
1.3.1. Регуляция подвижности нейтрофилов ионами кальция.....	23
1.3.2. Кальциевая регуляция подвижности жгутиков.....	25
1.3.3. Типы подвижности сперматозоидов и их регуляция внутриклеточной концентрацией кальция.....	26
1.4. Кальциевая сигнализация в немышечных клетках.....	29
1.4.1. Принципы кальциевой сигнализации.....	29
1.4.2. Ферменты и каналы, участвующие в кальциевой сигнализации.....	30
Мембранные кальциевые АТФазы и депо кальция.....	30
Кальциевые каналы в клетках млекопитающих.....	31
Фосфолипаза С.....	33
1.4.3. Кальциевая сигнализация в сперматозоиде человека.....	33

1.4.4. Сравнение кальциевой активации в сперматозоидах человека и мыши	35
1.4.5. Существующие математические модели кальциевой сигнализации в сперматозоидах.....	36
1.4.6. Существующие математические модели кальциевой регуляции подвижности сперматозоидов.....	38
1.4.7. Существующие экспериментальные модели хемотаксиса нейтрофилов	40
1.4.8. Математические модели хемотаксиса нейтрофилов	41
Глава 2. Материалы и методы.....	45
2.1. Материалы	45
2.2. Методы	45
Глава 3. Результаты.....	55
3.1. Хемотаксис нейтрофилов вблизи растущего тромба	55
3.1.1. Анализ движения нейтрофилов в проточной камере	55
3.1.2. Влияние параметров потока на характер движения нейтрофилов вокруг растущего тромба	60
3.1.3. Влияние различных подложек на рост тромба и движение нейтрофилов в проточной камере	62
3.1.4. Вклад компонентов крови в движение нейтрофилов вокруг растущего тромба.....	63
3.1.5. Адгезия нейтрофилов к подложке и к тромбу происходит интегрин- и кальций-зависимым образом.....	65
3.1.6. Математическое моделирование хемотаксиса нейтрофилов	66
3.2. Хемотаксис и кальциевая сигнализация	71
3.2.3. Наблюдение кальциевой сигнализации в нейтрофилах.....	71
3.2.4. Влияние скорости ветвления актина на рост ламеллиподии в хемотактирующем нейтрофиле	74
Глава 5. Обсуждение результатов	96
ВЫВОДЫ.....	102

Введение

Актуальность исследования

Нейтрофилы играют ключевую роль в тромбовоспалении [1] – взаимодействии иммунной системы, эндотелия и системы свертывания крови в процессе формирования тромба [2]. Их подвижность и распределение вблизи растущего тромба определяется целым набором явлений, включающих адгезию [3, 4], хемотаксис [4], случайное [5] и поток-опосредованное движение [3], а также взаимодействие с тромбоцитами, клетками эндотелия сосудов и межклеточным матриксом при их повреждении [1, 2]. Нарушения в процессе тромбовоспаления ассоциированы с патологическими состояниями, например, с онкологией, атеротромбозом и некоторыми аутоиммунными заболеваниями человека [1, 6]. Дефекты нейтрофилов, связанные с миграцией и нарушениями хемотаксиса, также характерны для врожденных иммунодефицитов [7].

Нейтрофилы рекрутируются на субстрат и взаимодействуют с ним посредством молекул адгезии, таких как селектины и интегрины [8, 9]. После адгезии, для данного типа клеток характерна актин-опосредованная амебоидная подвижность [3]. При миграции лейкоцит вступает в повторяющиеся циклы деформации. Сначала происходит рост ламеллиподии на переднем крае клетки с последующей её интеграцией и селектин-опосредованной адгезией к подложке. Формирование ламеллиподии на переднем крае зависит от полимеризации и ветвления актина и малых GTP-аз [10, 11]. Затем происходит опосредованное актомиозиновыми волокнами сокращение тела клетки и разрыв ранее сформированных сайтов адгезии с продвижением нейтрофила вперед [12]. При воздействии механических стимулов или распознавании хемокинов, состояние цитоскелета и интегринов регулируется целым набором вторичных мессенджеров, в том числе фосфоинозитидами [13] и внутриклеточной концентрацией ионов кальция [14].

Особую значимость подвижность нейтрофилов приобретает в контексте генетических иммунодефицитов, таких как синдром Швахмана-Даймонда [15] и синдром Вискотта-Олдрича [16]. При данных заболеваниях подвижность нейтрофилов нарушается, что приводит к сниженной резистентности к инфекциям и повышенной склонности к воспалительным заболеваниям [17, 18, 19]. Изучение механизмов регуляции подвижности нейтрофилов вблизи растущего тромба позволит глубже понять патофизиологию тромбовоспаления и предложить новые терапевтические подходы для лечения заболеваний, связанных с нарушениями миграции нейтрофилов.

Экспериментальные исследования показывают, что движение нейтрофилов в окрестности тромба определяется градиентами хемоаттрактантов, взаимодействием с тромбоцитами и плазменным звеном свертывания крови, а также активацией интегринов [1, 2, 20]. Однако до сих пор не было детально изучено, каким образом эти процессы регулируют движение нейтрофилов в условиях циркулирующей крови. Настоящее исследование направлено на изучение механизмов регуляции подвижности нейтрофилов вблизи растущего тромба в условиях *ex vivo*.

Степень разработанности темы исследования

В существующих экспериментальных моделях движения нейтрофилов используются нейтрофилы, выделенные из цельной крови [4, 21]. Однако было показано, что нейтрофилы очень чувствительны к сдвиговому напряжению и центрифугированию [22]. В данной работе разработана экспериментальная модель хемотаксиса нейтрофилов вокруг растущего тромба в цельной крови и доказано, что данное движение является именно хемотаксисом. Работы по анализу кальциевого ответа в хемотактирующих нейтрофилах млекопитающих описаны, но только для *in vitro* условий [23, 24].

В случае математического моделирования хемотаксиса нейтрофилов, существует целый ряд моделей, описывающих движение нейтрофилов к

модельным источникам хемоаттрактантов [25, 26, 27, 28, 29]. Однако в данной работе впервые был проведен вычислительный анализ полей хемоаттрактанта, возникающих вокруг реального растущего тромба, а также произведено математическое моделирование движения нейтрофилов в таких реалистичных полях концентрации хемоаттрактанта.

На настоящий момент существует ряд математических моделей, описывающих кальциевый ответ на прогестерон и регуляцию подвижности при помощи ионов кальция в сперматозоидах человека [30, 31, 32], однако существующие модели кальциевой активации количественно не описывают динамику концентрации кальция в сперматозоиде человека. Описанные в литературе модели регуляции подвижности сперматозоидов кальцием относятся либо к сперматозоидам беспозвоночных [32], либо не описывают управление кальциевым ответом на временах, соответствующих низкочастотным кальциевым осцилляциям (>100 с)[30, 31].

Цель исследования – характеристика подвижности нейтрофилов вблизи растущего тромба *ex vivo* и выявление механизмов ее регуляции

Задачи исследования

1. Разработка экспериментальной методики и определение условий, позволяющих наблюдать подвижность нейтрофилов в цельной крови на подложке вблизи растущего тромба *ex vivo*.

2. Исследование связи подвижности нейтрофилов вблизи растущего тромба с динамикой их кальциевой сигнализации в сравнении с соответствующими механизмами кальциевой регуляции подвижности у других эукариотических клеток.

3. Определение вкладов хемотаксиса, случайной миграции и опосредованного потоком движения в поведение нейтрофилов вблизи растущего тромба.

4. Выявление рецепторов и молекул-медиаторов, отвечающих за адгезию нейтрофилов к растущему тромбу в разработанной экспериментальной модели.

Научная новизна

Разработана новая экспериментальная модель *ex vivo* взаимодействия нейтрофилов с растущим тромбом и показано, что движение нейтрофилов в данной постановке является хемотаксисом и подходит для его анализа у пациентов.

Впервые был проведен анализ состояния тромбовоспаления для пациентов с синдромом Швахмана-Даймонда. Показано, что хемотаксис для данных пациентов нарушен не только для *in vitro* экспериментальных постановок с использованием fMLP в качестве модельного хемоаттрактанта, но и для *ex vivo* модели растущего тромба.

Экспериментально показано, что скорость роста ламеллиподии в нейтрофилах пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича не меняется по сравнению со здоровыми контролями. В рамках построенной минимальной математической модели актинового цитоскелета ламеллиподии показано, что на скорость роста ламеллиподии нейтрофила не влияет скорость ветвления актина и расстояние до мембраны, на котором происходит ветвление.

Проведено наблюдение кальциевой сигнализации в нейтрофилах человека в ходе хемотаксиса. Показано, что кальций регулирует разборку ламеллиподий, но не их выставление при хемотаксисе нейтрофилов

Впервые показано, что как и в нейтрофилах человека, в сперматозоидах млекопитающих кальциевая сигнализация регулирует выбор направления движения.

Теоретическая и практическая значимость

Разработанная экспериментальная методика наблюдения взаимодействия нейтрофилов и тромбоцитов в плоскопараллельной

проточной камере может быть использована для оценки хемотаксиса нейтрофилов здоровых доноров и пациентов, что позволит идентифицировать механизмы развития нарушений функции нейтрофилов. Особенностью разработанной экспериментальной модели является использование цельной крови, что исключает влияние протоколов выделения иммунных клеток на их активность, а также позволяет исследовать взаимодействие нейтрофилов с растущим тромбом. Разработанная модель может быть использована для исследования механизмов развития иммунологических заболеваний и исследования эффектов различных вариантов терапии на функцию нейтрофилов пациентов.

Методология и методы исследования

Анализ кальциевой сигнализации в сперматозоидах человека, а также роста псевдоподий и хемотаксиса нейтрофилов около растущего тромба осуществлялись с помощью флуоресцентной или световой микроскопии. Для идентификации клеток использовались специфичные флуоресцентно-меченные антитела, либо загрузка живых клеток флуорофорами Fura-Red, DiOC6, Fluo-8. Наблюдение специфических ответов клеток на активацию проводилось в плоско-параллельных проточных камерах. Разработка компьютерной модели проводилась следующим образом: на основе литературных данных строилась схема физико-химических процессов, которая ложилась в основу теоретической модели. Модель представляла собой систему обыкновенных дифференциальных уравнений, которая интегрировалась численным методом для интегрирования жёстких и нежёстких систем обыкновенных дифференциальных уравнений (LSODA) в среде разработки COPASI (COPASI.org), либо систему дифференциальных уравнений в частных производных, интегрируемых в программе Virtual Cell (<https://vcell.org/>) методом конечных объёмов или в программном пакете COMSOL Multiphysics методом конечных объёмов, либо систему

вероятностных уравнений, интегрируемых с помощью Python 3.8. Параметры моделей были либо взяты из литературных источников, либо подобраны на основании доступных из литературы данных или же данных, полученных экспериментально в рамках диссертационной работы. Полученные с помощью моделей предсказания проверяются экспериментально или на основе литературных данных.

Положения, выносимые на защиту

1. Движение нейтрофилов на коллагене в плоскопараллельной проточной камере вокруг растущего тромба является преимущественно хемотаксисом.

2. У хемоаттрагирующих нейтрофилов кратковременные подъемы внутриклеточного кальция сопряжены с ретракцией ламеллиподий, но не с их выставлением или поступательным движением клетки. При движении нейтрофилов и сперматозоидов наблюдаются изолированные пики цитозольного уровня кальция, ассоциированные с изменением направления.

3. Адгезия нейтрофилов к коллагеновой подложке и растущему тромбу преимущественно является интегрин-опосредованной.

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в анализе научной литературы, разработке и реализации всех представленных в работе математических моделей, в планировании и проведении экспериментов по микроскопии живых клеток, подготовке иллюстраций, написания научных статей и тезисов по материалам работы.

Достоверность и обоснованность результатов

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов обеспечивались использованием общепринятых современных методов, таких

как флуоресцентная микроскопия, статистическая обработка результатов, а также использованием распространенных методов математического моделирования и статистической обработки данных, реализованных в общедоступных программных пакетах. Достоверность полученных результатов также подтверждается их согласованностью с известными литературными источниками.

Апробация работы

Апробация работы проводилась на совместном расширенном заседании лаборатории внутриклеточной сигнализации и системной биологии, лаборатории физиологии и биофизики клетки, лаборатории молекулярных механизмов гемостаза, а также лаборатории биофизики цитоскелета федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук, протокол № 1 от 19.02.2025. Основные результаты диссертационной работы были представлены и обсуждались на 10 всероссийских и международных конференциях: International Student Congress Of (bio)Medical Sciences (4 июня – 8 июня 2018 года, Гронинген, Нидерланды), XXVI международная конференция «Математика. Компьютер. Образование» (28 января — 2 февраля 2019, Пущино, Россия); Международная конференция “Рецепторы и внутриклеточная сигнализация” (20 мая – 24 мая 2019 года, Пущино, Россия); European Congress on Thrombosis and Haemostasis 2019 (2-4 октября 2019, Глазго, Великобритания); Четырнадцатый съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, (17 июня –19 июня 2020 года, Минск, Беларусь); The 45th FEBS Virtual Congress, (3 июля — 8 июля 2021 года, Любляна, Словения); Международная конференция "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация", (22 мая – 26 мая 2023 года, Пущино, Россия); XXIV съезд физиологического общества им. П.П. Павлова, (11 сентября – 15 сентября 2023 года, Санкт-Петербург, Россия), Российский

Форум по Тромбозу и Гемостазу 2024 (14 марта –16 марта 2024 года, Москва, Россия), ESID 2024 Immunodeficiencies Meeting (16 октября – 19 октября, 2024 года, Марсель, Франция).

Публикации результатов исследования

По материалам диссертации было опубликовано 17 работ, в том числе 3 статьи в международных и российских рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для публикации результатов диссертационных исследований, 3 статьи в журналах, относящихся к Q1, 2 по МБД, 2 статьи в иных изданиях и 10 тезисов в сборниках трудов международных научных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 148 страницах машинописного текста и включает оглавление, введение, обзор литературы (глава 1), описание материалов и методов (глава 2), результаты (глава 3), и их обсуждение (глава 4), заключение, выводы, список использованной литературы (218 иностранных библиографических источников), список сокращений и обозначений, благодарности, приложения. Работа содержит 37 рисунков, 6 таблиц и 1 приложение.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Тромбовоспаление

Тромбовоспаление — взаимодействие между системой свертывания крови, иммунной системы и эндотелием. Тромбовоспаление играет важную роль в различных патофизиологических ситуациях, таких как бактериальная инфекция или рак [1]. Считается, что тромбовоспаление, в основном, вызвано взаимодействиями между нейтрофилами и тромбоцитами.

1.1.2. Тромбоциты

Тромбоциты - это безъядерные фрагменты мегакариоцитов, которые циркулируют в человеческой крови и играют важную роль как в гемостазе, так и в иммунитете [1]. Они содержат несколько жизнеспособных митохондрий, гликоген, два типа морфологически различных гранул (α -гранулы и плотные гранулы) и сложную систему мембран [33, 34, 35]. α -гранулы содержат молекулы адгезии, которые важны для взаимодействия тромбоцитов с тромбоцитами и взаимодействия тромбоцитов с другими клетками крови, митогенными факторами, белками плазмы и факторами, важными для свертывания и фибринолиза. Плотные гранулы хранят небольшие небелковые молекулы: АДФ, АТФ, серотонин, кальций и пирофосфат, которые играют центральную роль в усилении агрегации тромбоцитов и модуляции функции эндотелия сосудов и лейкоцитов [36].

1.1.3. Нейтрофилы

Нейтрофилы – первый тип иммунных клеток, рекрутирующийся в места воспаления. Эти клетки представляют собой самую многочисленную популяцию лейкоцитов в крови человека [37]. Для эффективной защиты организма во время воспалительного процесса нейтрофилам необходимо быстро достигать очагов воспаления. Эти клетки очень чувствительны к

стимуляции, они могут быстро и эффективно мобилизоваться в большом количестве в течение нескольких минут в область воспаления [25, 37].

Известно, что основными медиаторами активации нейтрофилов являются интерлейкин 8 (IL-8), фактор активации тромбоцитов (PAF), лейкотриен В4 (LTB4), компонент комплемента С5а и др. [32]. Данные молекулы инициируют активацию нейтрофилов, достаточную для перестройки цитоскелета. Рецепторы к всем перечисленным медиаторам, как и классические рецепторы к хемоаттрактантам (СХС-рецепторы), являются ассоциированными с G-белками рецепторами, преимущественно Gi-типа [38]. Одним из важнейших путей, запускаемых нейтрофильными GPCR, является активация фосфатидилинозитол-3-киназ (PI3K) и активация фосфолипазы С, приводящая к запуску кальциевой сигнализации [39].

1.1.4. Взаимодействие нейтрофилов и тромбоцитов при тромбовоспалении

Активированные тромбоциты опосредуют рекрутирование нейтрофилов в области повреждения сосудов. Повреждение эндотелия приводит к недостатку молекул адгезии, необходимых для рекрутирования нейтрофилов. В таких ситуациях тромбоциты прикрепляются к обнаженному субэндотелию. Такой процесс опосредован комплексом GPIIb-IX-V на тромбоцитах, иммобилизованным vWF и адгезией GPVI тромбоцитов к коллагену. После прикрепления тромбоциты могут экспрессировать большие количества P-селектина, создавая поверхность, к которой нейтрофилы могут прикрепляться за счет экспрессии PSGL-1. Затем следует прочная адгезия нейтрофилов к прилипшим тромбоцитам за счёт связывания Mac-1 с фибриногеном, иммобилизованным на GPIIbIIIa и GPIIba тромбоцитов [40].

Также когда тромбоциты активируются на месте повреждения или воспаления, они секретируют гранулы, содержащие P-селектин, фибриноген, фактор Виллебранда (vWF), факторы роста и хемоаттрактанты для лейкоцитов

[26, 41]. После активации тромбоциты выделяют комбинацию хемокинов, таких как АДФ или IL-8 [41], также на их поверхности генерируется другой хемокин, тромбин [42], что привлекает нейтрофилы к месту повреждения.

1.1.5. Этапы рекрутирования нейтрофилов к растущему тромбу:

роллинг, адгезия, хемотаксис

Состояние нейтрофилов в крови здорового человека называется «спящим состоянием». При появлении провоспалительных молекул, нейтрофилы переходят в состояние «роллинга» - качения по эндотелию [3]. Последующая стимуляция нейтрофилов хемокинами запускает активацию лейкоцитарных интегринов, обеспечивающих прочную адгезию и рекрутирование нейтрофилов на эндотелиальную поверхность или растущий тромб [8]. После адгезии нейтрофилы способны обнаруживать внеклеточные химические градиенты и двигаться в направлении более высоких концентраций хемоаттрактантов, исходящих от мест повреждения [21]. Данный процесс называется хемотаксисом.

Хемотаксис – это управляемое движение клеток, которое происходит в ответ на химические сигналы, исходящие от места повреждения или воспаления – хемоаттрактанты. Внутри сосуда хемоаттрактанты иммобилизуются гликозаминогликанами или гепарансульфатом составляющими гликокаликс эндотелиальных клеток [9, 43, 44]. За пределами сосудистого русла хемоаттрактанты могут ассоциироваться с внеклеточным матриксом и направлять миграцию нейтрофилов к очагам поражения. При отсутствии внешнего сигнала нейтрофилы также могут перемещаться [21], эта случайная и ненаправленная миграция называется хемотаксисом [45]. Особенно интересным является тот факт, что нейтрофил способен взаимодействовать с растущим тромбом [13].

Для таких амёбодно перемещающихся клеток, как нейтрофилы, макрофаги и фибробласты, характерна актин-опосредованная подвижность. В

этих клетках движение опосредовано актиновыми филаментами [3], непрерывно полимеризующимися и деполимеризующимися. Рост актиновых нитей приводит к образованию ламеллиподий, которые обеспечивают движение клетки в нужном направлении.

1.2. Подвижность эукариотических клеток

1.2.1. Типы подвижности эукариотических клеток

Клеточная локомоция у эукариот делится на две основные категории: жгутиковая подвижность (Рисунок 1) и актин-зависимая миграция клеток (Рисунок 2).

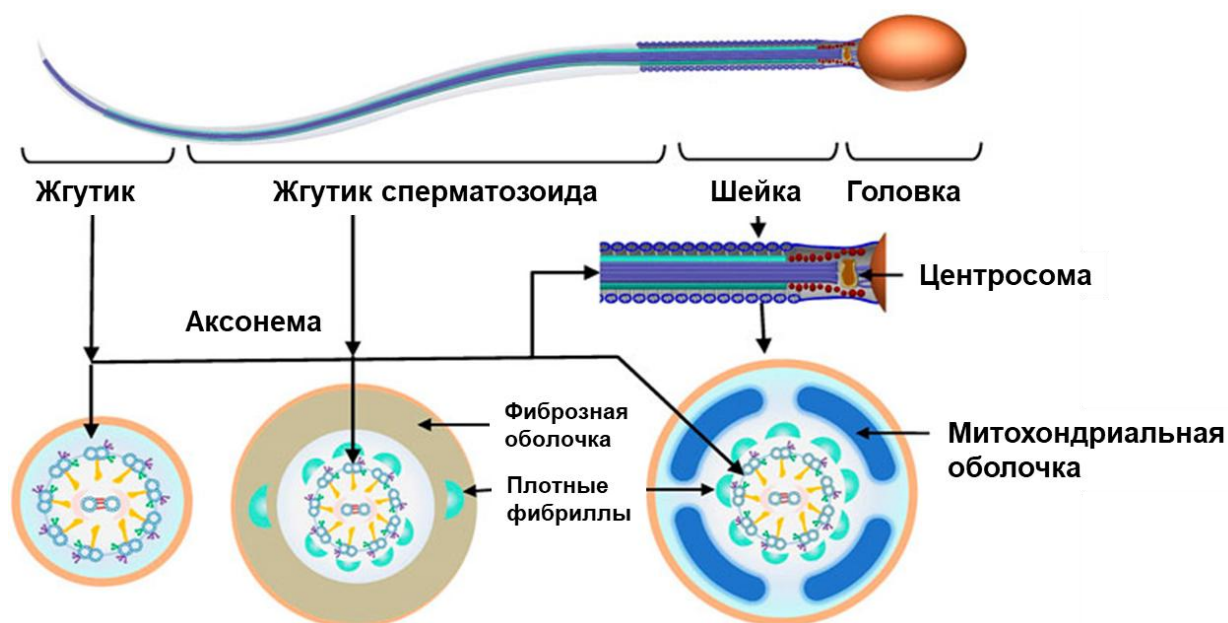


Рисунок 1 – Жгутиковая подвижность на примере сперматозоида. Сперматозоид разделяется на головку и жгутик. Жгутик, в свою очередь, подразделяется на три части: среднюю часть, основную часть и концевую часть. Центросома состоит из проксимальной и дистальной центриолей, которые прикрепляются к базальной пластине в области имплантационной ямки и формируют аксонему. Аксонема проходит через весь жгутик. В средней и основной части аксонема окружена наружными плотными фибриллами. Средняя часть также содержит митохондриальную оболочку, окружающую аксонему, которая в основной части заменяется фиброзной оболочкой. В концевой части отсутствуют периаксонемальные структуры. Адаптировано из [46]

Жгутиковая подвижность обеспечивается хлыстовидными органеллами, называемыми жгутиками, которые приводят клетки в движение в жидкой

среде или создают поток жидкости вдоль прикрепленных к поверхности клеток [47, 48, 49]. В отличие от этого, актин-зависимая миграция клеток обусловлена различными молекулярными механизмами, все из которых зависят от динамического обновления актиновых сетей, которые толкают и тянут клетки по твердым поверхностям или между ними [50, 51].

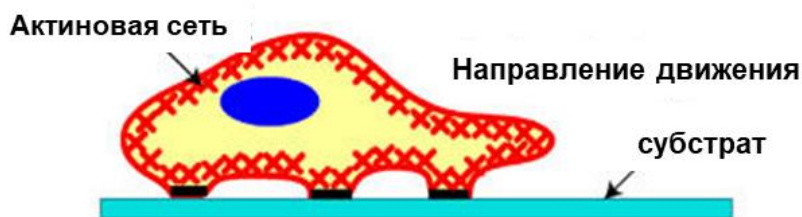
Жгутики и реснички эукариот представляют собой тонкие выросты на поверхности клетки, которые обеспечивают перемещение самой клетки или транспорт жидкости [46, 52]. Их внутреннее строение обычно описывают как аксонему в формате «9+2»: девять пар микротрубочек по периферии и ещё две микротрубочки в центре [47]. Каждая пара микротрубочек связана с соседней белками-нексинами и окружена моторными белками семейства динеинов [52, 53, 54]. Эти динеиновые «руки» используют энергию АТФ, «шагая» вдоль соседних микротрубочек и вызывая изгибания жгутика или реснички [47].

Другой крупный механизм подвижности у эукариот — это актин-зависимая система, использующая динамику актиновых филаментов в цитоскелете. Актин — глобулярный белок (G-актин), способный полимеризоваться в нити (F-актин). Эти нити образуют самые разные структуры (пучки, сети, ветвящиеся пластины), формируя механическую основу для поддержания формы клетки, эндоцитоза, цитокинеза и подвижности [50, 55, 56].

Типичным примером актин-зависимой подвижности служит амёбоидное движение, характерное для амёб и некоторых клеток млекопитающих (например, нейтрофилов). Во время такой миграции клетка формирует псевдоподии («ложноножки») — выпячивания мембраны, образующиеся за счёт полимеризации актина на переднем крае. Затем клетка закрепляется на подложке (при помощи интегринов и других белков), а задняя часть втягивается путём перестройки цитоскелета [8, 50, 51, 57].

Семейство моторных белков миозина также играет важную роль в актин-зависимой подвижности.

1) Выпячивание лидирующего конца клетки



2) Адгезия на лидирующем конце клетки



3) Движение клетки в целом



Рисунок 2 – актин-зависимая подвижность клеток на примере нейтрофилов. После определения направления движения клетка вытягивает выступ в этом направлении за счет полимеризации актина на переднем крае. Затем она прикрепляет передний край к поверхности, по которой движется, и открепляется в области тела клетки и заднего края. Наконец, клетка подтягивает все свое тело вперед за счет сократительных сил, генерируемых в области тела клетки и ее заднего края. Адаптировано из [58]

Например, миозин II взаимодействует с актиновыми филаментами, создавая сократительные силы, помогающие клетке перемещаться вперед [59]. Кроме того, особые формы актин-зависимой подвижности присутствуют при внутриклеточном транспорте (миозин V перевозит органеллы и везикулы по

актиновым «рельсам» [60]) и в мышечных клетках (скольжение актиновых и миозиновых филаментов лежит в основе мышечного сокращения) [61].

Способность быстро перестраивать актиновый цитоскелет важна для клеток, чтобы быстро реагировать на внешние сигналы, изменять форму и осуществлять такие процессы, как заживление ран и иммунные реакции. Нарушения в динамике актина могут приводить к серьёзным последствиям: деформациям во время эмбрионального развития [62], ослаблению иммунитета [15, 17] и усилению метастазирования при онкологических заболеваниях [63].

Оба типа подвижности — жгутиковая и актин-зависимая — требуют затраты энергии (обычно АТФ) для работы моторных белков, которые создают механическую силу [48].

1.2.2. Перестройка цитоскелета при движении нейтрофила

Лейкоциты взаимодействуют с субстратом посредством молекул адгезии, таких как селектины и интегрины [8, 9]. Селектины — белки из семейства молекул клеточной адгезии. Селектины являются трансмембранными гликопротеинами и состоят из единственной полипептидной цепи. Интегрины представляют собой гетеродимерные трансмембранные белки. Интегрины передают сигналы двунаправленно через плазматическую мембрану по путям, называемым «outside-in» и «inside-out». Каждый из этих путей опосредован конформационными изменениями структуры белка [64]. Цитоскелет соединяется с цитоплазматической частью интегринов посредством множества адаптерных белков. При воздействии механических стимулов или распознавании хемокинов, изменение концентрации ионов кальция регулирует состояние цитоскелета и интегринов [14].

При миграции по градиентам хемоаттрактанта лейкоцит вступает в повторяющиеся циклы деформации. Сначала происходит рост ламеллиподии

на переднем крае клетки с последующей интегрин и селектин-опосредованной адгезией к подложке. Формирование ламеллиподии на переднем крае зависит от полимеризации и ветвления актина и малых GTP-аз [10, 11]. Затем происходит опосредованное актомиозиновыми волокнами сокращение тела клетки и разрыв ранее сформированных сайтов адгезии с продвижением нейтрофила вперед [12].

Двумя основными малыми GTP-азами, определяющими формирование переднего края ламеллиподии, являются Ras-связанный субстрат-1 ботулинического токсина С3 (Rac1) и гомолог белка 42 контроля деления клеток (Cdc42) [65]. Задний конец клетки, уропод, обладает высокой сократимостью актомиозина, плохой адгезией и регулируется малой GTP-азой RhoA [66].

1.2.3. Полимеризация актинового цитоскелета при подвижности нейтрофилов

Полимеризация глобулярных (G) мономеров актина с образованием нитевидного (F) актина имеет решающее значение для миграции нейтрофилов [50, 67]. F-актин представляет собой ориентированные нити, растущие на так называемом колючем конце и деполимеризующиеся на тупом конце и толкающие клеточную мембрану вперед.

Нуклеация и полимеризация актина регулируются целым рядом белков, например, форминами и комплексом Arp2/3 [51, 67, 68]. Формины опосредуют нуклеацию линейных актиновых филаментов и регулируют их рост [69, 70]. Эти белки последовательно добавляют к актиновому филаменту мономеры актина, оставаясь при этом слабо связанными с быстрорастущим (колючим) концом нитей.

Комплекс Arp2/3 опосредует нуклеацию новых нитей актина на существующих актиновых нитей под углом 70° и тем самым создает дендритную актиновую сеть [51].

АСФ/кофилин представляет собой еще одно семейство актин-связывающих белков. Белок связывается как с G-актином, так и с F-актином и вызывает деполимеризацию на минус-конце нитей, тем самым предотвращая их повторную сборку. И PI(4,5)P₂, и PI(3,4,5)P₃ связываются с кофилином и ингибируют его активность [71].

1.2.4. Хемотаксис нейтрофилов и актиновый цитоскелет

Хемоаттрактанты, такие как формилпептиды (например, fMLP), интерлейкин-8 (IL-8) и лейкотриены, распознаются семейством рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCRs) [72]. Связывание лиганда с GPCR активирует гетеротримерный G-белок. G $\beta\gamma$ -субъединица играет ключевую роль в активации фосфатидилинозитид-3-киназы (PI3K) [73], что приводит к локальному накоплению фосфолипида PIP₃ на переднем крае клетки. PIP₃ рекрутирует активаторы Rac, которые стимулируют полимеризацию актина и формирование ламеллиподии. G α -субъединица, в свою очередь, активирует RhoA/ROCK-опосредованный сигнальный путь, способствующий сокращению актомиозинового цитоскелета и формированию уropода на заднем конце клетки [74]. На переднем конце клетки PI3K-индуцированное накопление PIP₃ активирует Rac1 [75], что способствует сборке актина и образованию ламеллиподии. На заднем конце клетки RhoA-опосредованная активация ROCK приводит к миозин-зависимому сокращению цитоскелета, поддерживая уropод и облегчая направленное движение [74]. Дополнительно, PTEN, фосфатаза, расщепляющая PIP₃, локализуется на заднем конце клетки, ограничивая активность PI3K и тем самым поддерживая поляризацию клетки. Помимо PI3K/Rac и RhoA/ROCK, важную роль в регуляции хемотаксиса играет сигнальный путь p38 MAPK, который модулирует динамику цитоскелета и усиление ответа на хемоаттрактант.

1.2.5. Нарушения хемотаксиса нейтрофилов при аутоиммунных заболеваниях

Нарушения хемотаксиса нейтрофилов наблюдаются при некоторых аутоиммунных заболеваниях человека. Дефекты нейтрофилов, связанные с миграцией и нарушениями хемотаксиса, характерны для врожденных иммунодефицитов [7]. Помимо нарушений и ингибирования хемотаксиса ниже адгезии у пациентов с недостаточностью адгезии лейкоцитов I-III [76], у пациентов с тяжелой врожденной нейтропенией было выявлено нарушение хемотаксиса нейтрофилов из-за их гомозиготной мутации в генах глюкозо-6-фосфатазы и транспортера глюкозо-6-фосфатазы-1 [77].

Синдром Вискотта-Олдрича (WAS) — это сцепленное с X-хромосомой заболевание, характеризующееся тромбоцитопенией, экземой и прогрессирующим снижением иммунной функции. Известно, что комплекс Arp2/3 активируется белками семейства WASP (белок синдрома Вискотта-Олдрича) [78]. Из-за нарушения полимеризации актинового цитоскелета макрофаги пациентов с WAS, имеют серьезно нарушенную миграцию в ответ на fMLP и на хемокин моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (MCP-1) по сравнению с нормальными донорами [17].

Синдром Швахмана-Даймонда (СШД) — это генетическое заболевание, вызванное биаллельными дефектами в гене SBDS и характеризующееся нарушениями в работе поджелудочной железы и костного мозга [18]. Исследования Stepanovic et al. [15] показали, что при СШД нарушено направленное движение нейтрофилов, но не случайное движение. В отсутствие хемоаттрактантов нейтрофилы СШД двигаются аналогично нейтрофилам здоровых доноров, в то время как в пространственном градиенте fMLP нейтрофилы от пациентов с СШД демонстрируют сниженную линейную скорость движения, устойчивость направления движения и изменение направления в ответ на хемоаттрактант. Нейтрофилы пациентов с СШД демонстрировали дефект хемотаксиса (но не случайного движения) из-за

измененной полимеризации F-актина, что приводит к неэффективной ориентации нейтрофилов по направлению к хемотаксическому химическому градиенту [19].

1.3. Регуляция подвижности клеток ионами кальция

И жгутиковая, и флагеллярная подвижность контролируются концентрацией ионов кальция в цитозоли ($[Ca^{2+}]$) [23, 32]. В немышечных клетках (например, иммунных или половых) кальциевый ответ начинается с активации мембранных рецепторов внешними стимулами — сигнальными молекулами или механическим воздействием.

При этом оба основных типа внутриклеточной сигнализации — G-белковая и тирозинкиназная — приводят к низлежащей активации фосфолипазы C (PLC) [24, 79, 80]. PLC расщепляет мембранный липид фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (PIP_2) на две сигнальных молекулы: инозитолтрифосфат (IP_3) и диацилглицерол (DAG). IP_3 связывается с кальциевыми каналами к инозитолтрифосфату (IP_3R) на кальциевых депо или плазматической мембране [81, 82], вызывая вход ионов кальция в цитоплазму.

Кальциевый ответ регулирует клеточную подвижность целым набором способов. Ионы кальция, в зависимости от типа клетки и ситуации, могут либо усиливать подвижность, либо тормозить отдельные фазы движения (к примеру, способствовать разборке уже сформированных актиновых структур [83, 84].

Так, в жгутиковых клетках, например, сперматозоидах, кальций способен регулировать работу молекулярных моторов динеинов [54], что приводит к изменению частоты и симметрии биения жгутика. В ползающих клетках, например, нейтрофилах, кальций управляет сборкой и разборкой актинового цитоскелета [85].

1.3.1. Регуляция подвижности нейтрофилов ионами кальция

Особый интерес вызывает феномен «локальных» колебаний $[Ca^{2+}]$ в периферических областях нейтрофила, которые могут влиять на пространственную организацию цитоскелета, а значит и на направленное движение клетки [86, 87, 88]. Считается, что кальциевая сигнализация не только необходима для запуска миграции, но и тонко модулирует динамику полимеризации и деполимеризации актина. Наряду с этим, существует и точка зрения, что в определённых условиях нейтрофилам не всегда требуется значимая мобилизация кальция для направленной миграции [89].

Известно, что в нейтрофилах мыши хемотаксис к таким хемоаттрактантам, как LPS, CXCL2, H₂O₂ и C5a, опосредован поднятием концентрации кальция на переднем конце клетки [90]. В данном типе клеток поднятие концентрации кальция связано с событиями смены направления движения клетки, а также контролирует кривизну траекторий [90].

Такие регуляторы движения нейтрофилов, как PI3K, Rac и Lyn, влияют на хемотаксис путем модуляции амплитуды осцилляций кальция [90, 91]. Внутриклеточные импульсы кальция являются универсальными регуляторами подвижности в нейтрофилах мыши, определяя будущее направление формирования псевдоподий [90].

Активность многих актин-связывающих белков регулируются ионами кальция [92, 93]. Такие актин-связывающие белки как α -актинин ([94, 95]), фибрины/пластины [96, 97] и EFHD/свипросин [98, 99], содержат участок EF-ручка и способны обратимо связывать ионы кальция (Рисунок 3). Также регулирующие белки могут либо связываться с комплексом кальций/кальмодулин (CaM), либо непосредственно связывать ионы кальция с помощью кальмодулиноподобных доменов (CaMD) для инициирования специфических кальций-зависимых процессов ([100, 101]).

Одним из самых многочисленных белков (до 1% всех белков), регулирующих сборку актинового цитоскелета, является гельсолин.

Гельсолин принадлежит к суперсемейству актин-связывающих белков (ABP), экспрессируемых у всех эукариот. Это многофункциональный белок, связывающий актин кальций-зависимым образом, состоящий из шести повторов по 120–150 аминокислот. Активность гельсолина стимулируют ионы кальция [84]. Активированный гельсолин может разрушать актиновые филаменты при $[Ca^{2+}] > 10 \text{ мкМ}$.

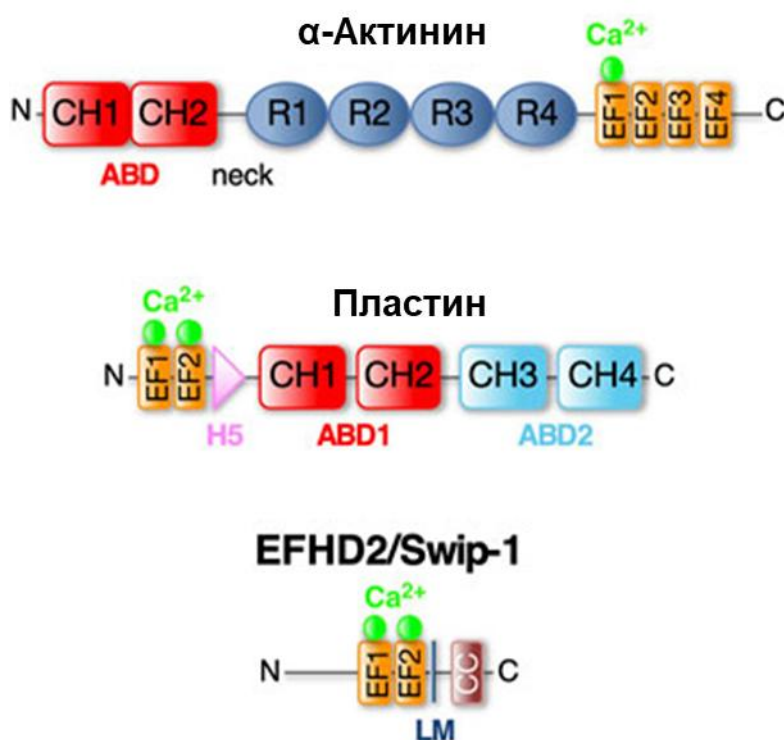


Рисунок 3 – кальциевая регуляция актин-связывающих белков. α -Актинин, пластин и EFHD2/свипросин-1 — три консервативных актин-связывающих белка с доменом EF-ручка, чья активность регулируется $[Ca^{2+}]$. Схематическая диаграмма доменов белка α -актинина, пластана и EFHD2/свипросина-1, а также структурные и функциональные изменения в ответ на кальций. Обозначены домены: ABD (актин-связывающий домен) состоит из двух доменов CH (кальпонин-гомологичный домен); EF-hand, связывающий кальций (зеленые сферы); R (спектриноподобные повторы), способствующие димеризации α -актинина; LM (домен имитации лиганда); SS (спирально-свернутый домен), способствующий димеризации EFHD2/свипросина-1. Адаптировано из [85]

При концентрациях в субмикромольном диапазоне гельсолин кэпирует зазубренные концы актиновых нитей. Кроме того, ионы кальция могут косвенно воздействовать на актин-связывающие белки через активацию кальцийзависимых киназ (например, протеинкиназа C) и малых Rho-GTP-аз.

За счет перечисленных механизмов даже небольшой подъем $[Ca^{2+}]$ способен регулировать циклы локального втягивания лемеллиподий и адгезии [102, 103, 104].

1.3.2. Кальциевая регуляция подвижности жгутиков

Структурная основа большинства эукариотических жгутиков, называемая аксонемой в которой динеиновые ручки и радиальные спицы координируют гидролиз АТФ, порождая механические силы. Аксонема представляет собой цилиндрическую структуру и состоит из девяти внешних пар микротрубочек (А и В), связанных между собой нексиновыми мостиками и прикрепленных к центральной паре микротрубочек радиальными спицами. Эта структуру обозначают термином «конфигурация 9 + 2». В каждой паре микротрубочек под действием АТФ происходит взаимное скольжение, обеспеченное связью с аналогичной соседней парой микротрубочек через динеин [105]. Однако частота и форма этих механических колебаний жёстко регулируются внутриклеточной концентрацией кальция, что позволяет жгутикам приспосабливать свои ритмы биения к изменяющимся условиям внешней среды [106].

Когда уровень кальция в жгутиковой области повышается, динеин-опосредованное скольжение микротрубочек становится асимметричным, переводя жгутиковое движение от симметричного биения к более выраженному, «хлыстообразному» режиму [107, 108]. Этот феномен особенно хорошо изучен у водорослей, например, у *Chlamydomonas reinhardtii*, где изменения подвижности необходимы для фототаксиса и хемотаксиса [109]. Кальций-индуцированные перестройки движения жгутиков опосредуются кальций-связывающими белками, включая кальмодулин, центрин, а также специализированные рецепторы кальция, локализованные в аксонеме [48, 54, 110–112]. При связывании с ионами кальция эти белки претерпевают конформационные изменения, тем самым регулируя активность динеиновых ручек и скольжение микротрубочек.

Кроме того, специальные ионные каналы, в частности кальций-зависимые каналы, встроенные в мембрану жгутика, играют решающую роль в обеспечении быстрого притока ионов кальция. Это позволяет клетке интегрировать различные сигнальные пути и оперативно реагировать на внешние раздражители, такие как свет, механическое воздействие или химические градиенты [110, 113]. Более того, расположение этих каналов в определённых субрегионах жгутика обеспечивает высокоточное локальное регулирование кальциевых сигналов и динеиновой активности [114].

Взаимодействие между кальцием и другими сигнальными молекулами — например, циклическим аденозинмонофосфатом (сАМФ) и IP_3 — дополнительно уточняет чувствительность жгутиков, позволяя изменять частоту биения и его форму под влиянием множества внутриклеточных факторов [115, 116]. Быстрое удаление ионов кальция с помощью насосов и обменников возвращает их уровень к низким значениям, когда стимул прекращается, предотвращая постоянную гиперактивацию аксонемы и сохраняя адекватную работу жгутика [117].

В итоге, сложная система кальций-зависимой регуляции активности жгутиков подчёркивает её жизненно важную роль в выживании эукариот, обеспечивая не только локомоцию, но и видоспецифическое узнавание и слияние гамет при половом процессе [118]. За счёт точной пространственной и временной активации динеиновых ручек кальций помогает клеткам эффективно ориентироваться в среде, реагировать на внешние сигналы и проходить важные этапы своего жизненного цикла [119].

1.3.3. Типы подвижности сперматозоидов и их регуляция внутриклеточной концентрацией кальция

Подвижность сперматозоидов является ключевым фактором, влияющим на доставку отцовского генетического материала к яйцеклетке. Жгутик сперматозоида позволяет производить асимметричные ритмичные движения в

трех плоскостях [120]. Контроль характера движения жгутика производится при помощи аксонемы, являющейся центральной частью жгутика и обеспечивающей каркасную функцию [121]. Скольжение микротрубочек в аксонеме позволяет изгибать жгутик сперматозоида в различных направлениях и регулирует асимметрию его движения [46, 122].

В литературе описаны два основных типа подвижности сперматозоидов млекопитающих: нормальная и гиперактивированная подвижность [108, 112, 123]. Нормальная подвижность сперматозоидов характеризуется плавными и поступательными движениями. Сперматозоиды с нормальной подвижностью движутся прямолинейно, что позволяет им эффективно продвигаться к яйцеклетке [123]. В основе этой подвижности лежит симметричное движение жгутика сперматозоида. Такой тип подвижности как гиперактивация характеризуется усиленными асимметричными биениями жгутиков и неупорядоченными траекториями. Гиперактивация возникает, как правило, на поздних стадиях пути сперматозоидов к яйцеклетке [107, 112, 123].

Кроме кальциевой сигнализации, гиперактивация сперматозоидов регулируется сАМР-зависимой активацией протеинкиназы А [124, 125], активность которой приводит к фосфорилированию белков, участвующих в движении жгутика сперматозоидов [105]. В сперматозоидах млекопитающих доминантной формой аденилатциклазы (катализирует производство сАМР) является растворимая аденилатциклаза (sAC), изоформы которой чувствительны к концентрациям бикарбоната и кальция [126, 127].

Для многих типов жгутиковых клеток, в том числе и для сперматозоидов, показано, что асимметрия биения жгутика может регулироваться концентрацией ионов кальция в цитозоле. $[Ca^{2+}]$, по-видимому, также влияет на динеиновые моторы, расположенные по одну сторону кольца динеиновых дублетов [54, 107, 108]. Предполагается, что высокие уровни $[Ca^{2+}]$ могут блокировать определенные динеины в состоянии

устойчивой активации, что приводит к созданию силы и изгибающего момента, действующих на сгибание жгутика в одном направлении [110].

В аксонемах сперматозоидов беспозвоночных кальций-чувствительные элементы были обнаружены напрямую на молекулах динеина [54, 128] (Рисунок 4). Для сперматозоидов млекопитающих молекулярные механизмы, регулирующие активность жгутиков при гиперактивации, не установлены, однако показано, что кальций-связывающие белки, такие как кальмодулин и центрин, связаны с аксонемой сперматозоидов млекопитающих [129, 130].

Некоторые эффекты ионов кальция на жгутик могут быть опосредованы СаМ, поскольку ингибирование СаМ снижает подвижность сперматозоидов у людей, грызунов и свиней [111]. Также было показано, что гиперактивация в сперматозоидах грызунов может быть сопряжена с кальциевыми осцилляциями.

Прогестерон (Р4) является хемоаттрактантом для сперматозоидов различных видов млекопитающих и хорошо известным индуктором кальциевого ответа, гиперактивации [131, 132, 133] и акросомной реакции [133, 134]. Показано, что акросомная реакция индуцируется Р4 в дозах порядка мкг/мл (или мкМ) [133, 135], а гиперактивация индуцируется концентрациями порядка нг/мл (или нМ) [131, 136].

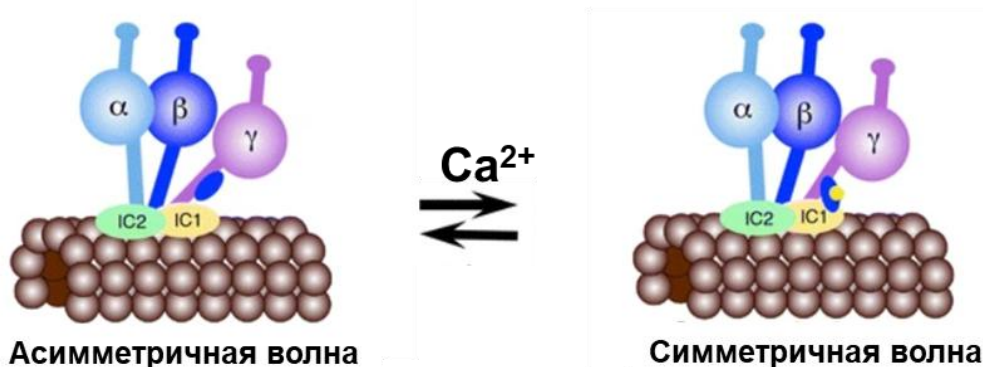


Рисунок 4 - Влияние кальция на подвижность жгутика в сперматозоидах асцидий. В асцидиях *Ciona* кальциевый сенсор калаксин связывается с тяжёлой β -цепью динеина асцидий, подавляет скольжение микротрубочек и вызывает распространение асимметричной волны при высокой $[Ca^{2+}]$. Воспроизведено из [54]

1.4. Кальциевая сигнализация в немышечных клетках

1.4.1. Принципы кальциевой сигнализации

Кальциевая сигнализация – один из ключевых способов передачи сигнала в эукариотических клетках. Концентрация свободных ионов кальция ($[Ca^{2+}]$) в цитозоли клеток зависит от работы десятков различных каналов, проницаемость которых регулируется состоянием клетки [137].

Ионы кальция активно перекачиваются из цитозоля во внеклеточное пространство или внутриклеточные хранилища, а также могут потенциал-зависимо попадать в матрикс митохондрий. $[Ca^{2+}]$ в цитозоли клеток млекопитающих составляет 10-100 нМ, в то время как во внеклеточной среде и внутриклеточных депо от 0,1 до 2 мМ. Это приводит к тому, что $[Ca^{2+}]$ в цитозоле может значительно изменяться даже при кратковременном открытии кальциевых каналов [138].

Второе свойство кальция, делающее его очень подходящим внутриклеточным мессенджером, заключается в его высокой афинности к комбинации карбоксильных и карбонильных групп в условиях нейтральной кислотности цитозоли клетки [139]. Способность иона кальция образовывать координационные связи позволяет ему вызывать значительные конформационные изменения связавшего его белка [138].

Кальциевые сигналы часто организованы в сложные временные и пространственные структуры [140, 141, 142]. Передача кальциевых сигналов включает в себя целый ряд событий с характерными временами, отличающимися на порядки. Так, открытие потенциал-управляемых кальциевых каналов происходит за миллисекунды, распространение кальциевых волн – от долей секунд до десятков секунд в зависимости от размеров клетки, согласованные открытия кластеров каналов на кальциевых депо – за десятки миллисекунд, характерные времена кальциевых осцилляций – десятки и сотни секунд.

В некоторых клетках возникают волны кальция, которые могут распространяться по всему объему или быть ограниченными каким-либо клеточным субкомпарментом. Пространственная неоднородность кальциевого ответа может являться результатом ограниченного расстояния диффузии кальция из-за распределения компонентов системы кальциевой сигнализации либо связывания с буферными белками.

1.4.2. Ферменты и каналы, участвующие в кальциевой сигнализации

Мембранные кальциевые АТФазы и депо кальция

Регуляция внутриклеточной концентрации осуществляется с помощью комбинации кальциевых каналов, способствующих входу ионов в цитозоль под действием электрохимического потенциала, и АТФ-аз, способных транспортировать (перекачивать) его против градиента концентрации с затратами энергии. Клетки млекопитающих имеют два основных источника ионов кальция для генерации сигналов: внутриклеточные мембранные депо и внеклеточное пространство (Рисунок 5).

Регуляция $[Ca^{2+}]$ производится с помощью комбинации кальциевых каналов кальциевых помп – АТФаз. На плазматической мембране клетки присутствуют как кальциевые АТФазы (plasmatic membrane calcium ATPase, PMCA) [143], так и натрий-кальциевые обменники (NCX), «выкачивающие» ион кальция за счет его обмена на 2 или 3 иона натрия.

На плазматической мембране различных органелл присутствует ещё два типа кальциевых АТФаз, кальциевая АТФаза секреторного пути (secretory pathway Ca^{2+} -ATPase, SPCA) и кальциевая АТФаза саркоплазматического ретикулума (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA) [144, 145], также вносящие значительный вклад в регуляцию концентрации кальция и аккумуляции кальция в кальциевых депо.

Эндоплазматический ретикулум в немышечных клетках и саркоплазматический ретикулум в мышечных клетках являются основными

типами кальциевых депо [144, 146]. Однако другие органеллы — аппарат Гольджи, ядерная оболочка, лизосомы и другие кислые везикулы — также могут участвовать в хранении кальция [147, 148].

Кальциевые каналы в клетках млекопитающих

Основными каналами, опосредующими повышение $[Ca^{2+}]$ в ответ на активацию в неммышечных клетках, являются каналы-рецепторы к вторичному мессенджеру инозитол-1,4,5-трифосфату (IP_3) – IP_3R [149]. Кроме того в некоторых неммышечных клетках встречаются основные каналы миоцитов - рианодиновые рецепторы (RyR) [150]. Во плазматической мембране всех клеток присутствуют двухпоровые каналы (TRP), которые могут быть потенциал-зависимыми [151]. При этом кальциевая сигнализация в мышечных и неммышечных клетках имеет различный вид. Возбудимые клетки характеризуются наличием рианодиновых рецепторов и потенциал-управляемых каналов, переносящих преимущественно Na^+ , K^+ и Ca^{2+} [152]. Их активация вызывается деполяризацией мембраны, и приводит к генерации потенциалов действия по принципу «все или ничего». В неммышечных клетках мобилизация кальция в первую очередь определяется активностью фосфолипазы C (PLC) [153], хотя возможна активация и через агонист-зависимые кальциевые каналы-рецепторы, например, пуренэргический рецептор $P2X_1$.

Каноническая IP_3 -зависимая кальциевая сигнализация состоит в следующей последовательности событий. Связывание агониста с рецептором на клетке приводит к активации различных изоформ PLC, которая, в свою очередь, катализирует расщепление мембранного фосфоинозотида PIP_2 до IP_3 и диацилглицерола (DAG). IP_3 запускает открытие рецепторов к инозитолтрифосфату (IP_3R), находящихся на кальциевых депо, плазматической или ядерной мембране [154].

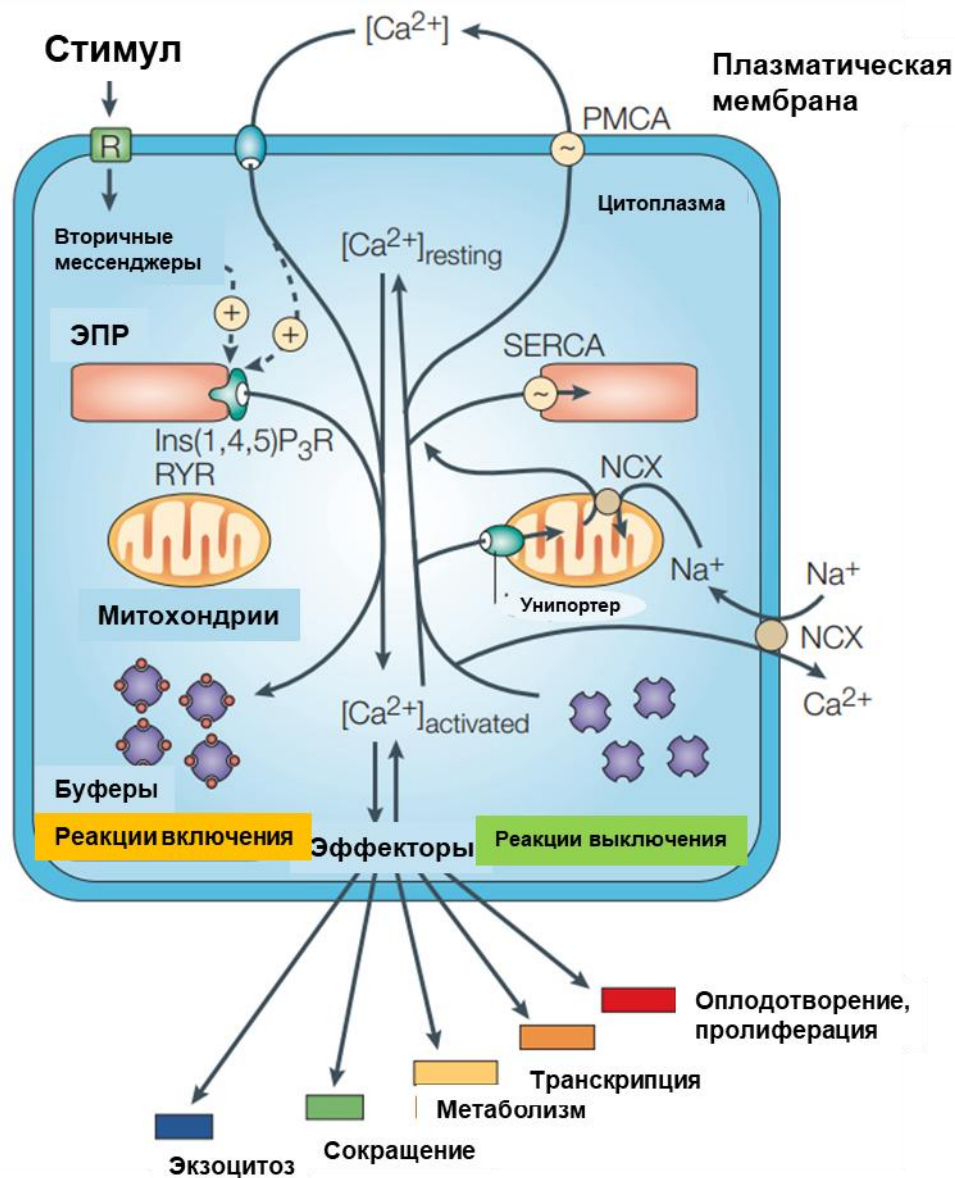


Рисунок 5 – Общая схема кальциевой сигнализации в клетках эукариот. Во время активации, стимулы вызывают как поступление кальция из внешней среды, так и образование вторичных мессенджеров, которые высвобождают ионы кальция из эндоплазматического/саркоплазматического ретикулума (ЭПР/СР). Большая часть этого запаса кальция связывается с буферными белками, в то время как небольшая часть связывается с эффекторами, активируя различные клеточные процессы, протекающие в широком временном диапазоне. После активации, ионы кальция покидают эффекторы и буферы и удаляются из клетки с помощью различных обменников и насосов. Обменники $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) и Ca^{2+} -АТФаза плазматической мембраны (PMCA) выводят кальций наружу, тогда как кальциевая АТФ-аза саркоплазматического/эндоплазматического ретикулума (SERCA) закачивает кальций обратно в ЭПР. Митохондрии также играют активную роль в данном процессе, быстро захватывая кальций через унипортер. Перевод обозначений: Ins(1,4,5)P₃R – рецептор к инозитол-1,4,5-трифосфату; RYR – риаудиновый рецептор. ER/SR – сарко/эндоплазматический ретикулум. NCX – Обменники $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Cytoplasm – цитоплазма. Адаптировано из [153]

Механизм регуляции PLC δ пока что не слишком хорошо изучен; тем не менее, предполагается, что её ферментативная активность может быть стимулирована только повышением [Ca²⁺][156].

Фосфолипаза С

Фосфолипаза С (КФ 3.1.4.3, англ. phospholipase C) — фосфолипаза, гидролизующая фосфодиэфирную связь между глицериновым остатком фосфолипида и полярной фосфатной группой [155]. Она относится к фосфодиэстеразам. Фосфолипаза С является ключевым ферментом метаболизма фосфатидилинозитола и липидных сигнальных путей.

Фосфолипаза С катализирует производство IP₃ из PIP₂. В настоящий момент у млекопитающих известно 13 изоформ фосфолипазы С, отличающихся по структуре и механизмам регуляции: PLC β (PLC β 1–4), PLC γ (PLC γ 1 и 2), PLC δ (PLC δ 1, 3, и 4), PLC ϵ (PLC ϵ) и PLC ζ [80]. Различные изоформы имеют различный набор регуляторных доменов. Так, PLC β обычно активируется G-белками, PLC γ – тирозинкиназами [80].

1.4.3. Кальциевая сигнализация в сперматозоиде человека

Регуляция внутриклеточной концентрации в сперматозоиде человека осуществляется на тех же принципах, что и для прочих немышечных клеток. Однако кальциевая сигнализация в сперматозоиде имеет ряд особенностей.

Так, единственной изоформой фосфолипазы С, чья активность является существенной для акросомальной реакции в сперматозоидах млекопитающих, является изоформа δ [157], активность которой регулируется концентрацией ионов кальция в цитозоле [80].

Связывание кальция с мотивом EF-ручка способствует перемещению PLC δ из цитозоли в плазматическую мембрану. Также ионы кальция регулируют активность PLC δ , способствуя образованию тройного комплекса

фермент-фосфатидилсерин- Ca^{2+} [158]. Это приводит к 20-кратному увеличению сродства фосфолипазы к PIP_2 .

В сперматозоидах мыши данная изоформа фосфолипазы является необходимой для успешной акросомной реакции, однако также присутствует и является важной изоформа $\beta 1$ [159].

Кроме того, в отличие от большинства соматических клеток, в которых кальциевым депо является эндоплазматический ретикулум, в сперматозоидах млекопитающих им служит производная ядерной оболочки, RNE (redundant nuclear envelope) и акросома [160, 161]. RNE образуется во время созревания сперматозоидов из клеток-предшественников, когда после конденсации ядерного хроматина остается избыточная ядерная оболочка.

В активации сперматозоидов млекопитающих ключевым элементом является кальциевый канал CatSper (Рисунок 6) [162, 163]. CatSper представляют собой ионные каналы, которые отдаленно родственны каналам TRP [163, 164].

В зависимости от вида разнятся активаторы кальциевого канала CatSper. У человека канал активируется прогестероном или простагландином PGE_2 [131, 162, 163]. PGE_2 активирует CatSper напрямую [163], тогда как прогестерон активирует находящийся в жгутике и колокализированный с CatSper фермент AVHD2, который расщепляет мембранный липид 2-арахидоноилглицерол, ингибирующий CatSper в покое, и, таким образом, активирует данный канал [162].

CatSper как у приматов, так и у мышей активируются подщелачиванием цитоплазмы, но мышинный CatSper нечувствителен к другим активаторам CatSper: прогестерону и простагландинам [131, 162].

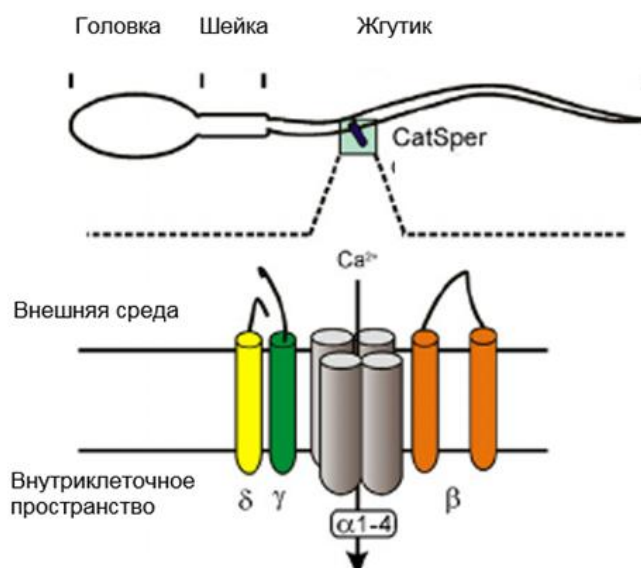


Рисунок 6 – Кальциевый канал CatSper. Гетеромерный кальциевый канал CatSper находится в жгутике сперматозоида и состоит по меньшей мере из десяти субъединиц с четырьмя порообразующими α -субъединицами (CatSper 1–4) и шестью вспомогательными субъединицами. Адаптировано из [165]

1.4.4. Сравнение кальциевой активации в сперматозоидах человека и мыши

Несмотря на то что кальциевая сигнализация в сперматозоидах мыши обладает теми же свойствами, что и у человека, а именно, индуцируется в ответ на прогестерон, реализуется в виде осцилляций или одиночных пиков и индуцирует акросомную реакцию, ее молекулярные механизмы существенно отличаются [16]. Описанный выше механизм не работает так же, так как в сперматозоидах мыши содержание 2-AG недостаточно высоко для его реализации, CatSper нечувствителен к прогестерону, а AVHD2 расположена в мембране акросомы (органелла, находящаяся в передней части головки сперматозоида), а не в жгутике [6]. Также известно, что кальциевым депо в сперматозоиде мыши является акросома, а не избыточная ядерная мембрана [17]. Точный механизм прогестероновой активации сперматозоидов мыши не установлен. Известно, что арахидоновая кислота способна индуцировать акросомную реакцию в том же объеме, что и прогестерон [18], в ходе активации генерируется простагландин E2 (PGE2) [19], который способен

запускать акросомную реакцию [20], а мышинный канал CatSper, наоборот, нечувствителен к простагландинам и прогестерону [21]. При этом показано, что в индукции акросомной реакции прогестероном участвуют G-белки и некоторая изоформа фосфолипазы C [18], при этом конкретный рецептор, сопряженный с G-белком (GPCR), не установлен (Рисунок 6).

1.4.5. Существующие математические модели кальциевой сигнализации в сперматозоидах

На настоящий момент опубликовано несколько работ по кальциевой сигнализации в сперматозоидах человека. В работе [166] были продемонстрированы относительные изменения флуоресценции в сперматозоидах мыши в ответ на стимуляцию рекомбинантными гликопротеинами прозрачной оболочки. Были проведены работы по прогестероновой активации сперматозоидов хряка, описывающие концентрацию кальция как в цитозоли, так и в кальциевом депо [167]. Также есть работы, описывающие динамику кальция в ходе капацитации сперматозоидов [168, 169].

В сперматозоидах млекопитающих наблюдалось несколько типов кальциевых ответов, таких как одиночный пик кальция [131, 132], устойчивое повышение концентрации кальция [131, 132] и кальциевые осцилляции [170]. Тем не менее, еще не было опубликовано ни одной статьи с экспериментами по определению точной концентрации кальция в отдельных клетках.

Существует так же несколько моделей кальциевого ответа в сперматозоидах млекопитающих. В 2011 году была построена модель [171] кальциевого ответа в ответ на cAMP, в которой была показана важность высвобождения кальция из депо. Также существует одномерная модель передачи сигналов кальция в ответ на прогестерон [172]. Однако ни одна из этих моделей не содержит новых данных о точном механизме активации CatSper с помощью прогестерона, опубликованных только в 2016 году

[162, с. 201], а высота и форма кальциевого пика и частота кальциевых осцилляций, наблюдаемых в части клеток [132, 170] не воспроизводятся достаточно хорошо.

Также в существующих моделях не уделяется внимания пространственной конфигурации исследуемой системы. В сперматозоидах млекопитающих кальциевый канал CatSper и PMCA находятся в жгутике клетки, в то время как кальциевые депо – либо в шейке [112] в сперматозоидах человека, либо в передней части головки в случае сперматозоидов мыши [173].

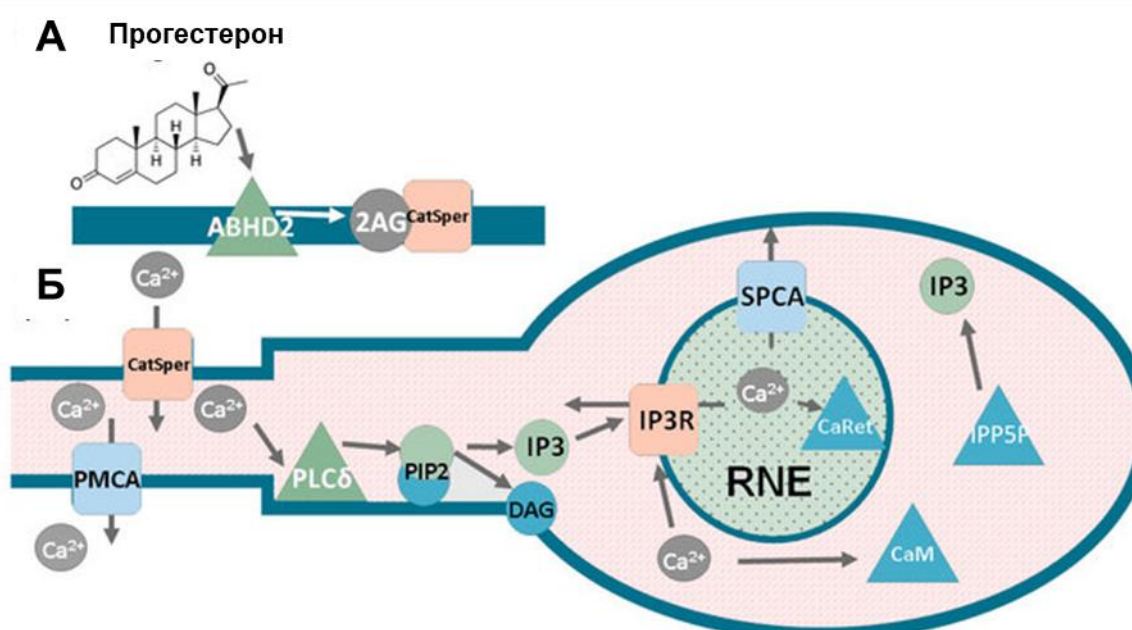


Рисунок 7 – Схема кальциевой сигнализации в сперматозоидах человека. А. В покое канал CatSper ингибируется липидом плазматической мембраны 2-арахидоноилглицеролом (2-AG). Прогестерон активирует фермент ABHD2, который расщепляет 2-AG на арахидоновую кислоту и глицерол, и таким образом активирует CatSper. Б. Ионы кальция входят в цитозоль через открытые каналы CatSper и затем диффундируют в шейку сперматозоида, где расположена изоформа фосфолипазы C PLCδ. Активность этого фермента повышается при повышении концентрации ионов кальция; PLCδ катализирует образование IP₃. IP₃ активирует IP₃-рецепторы-каналы (IP₃R), расположенные на кальциевом депо сперматозоида, RNE (избыточная ядерная оболочка), и таким образом индуцирует высвобождение кальция в цитозоль клетки. Кальциевая АТФ-аза плазматической мембраны (PMCA), присутствующая в мембране жгутика сперматозоида, выкачивает кальций во внеклеточную среду. Кальциевая АТФаза сигнального пути (SPCA) закачивает кальций в кальциевые хранилища RNE. Более того, кальциевые буферы, такие как кальмодулин (CaM), расположенные в цитозоле, и кальретикулин (CaRet), расположенный в эндоплазматическом ретикулуме, могут обратимо связывать кальций. IP₃ метаболизируется инозитол полифосфат 5-фосфатазой (IPP5P)

Компьютерных моделей кальциевой активации сперматозоидов мыши не существует вовсе.

Обычно для одного типа соматических клеток сигнальные пути довольно однородны в рамках таксона. Но сперматозоиды разных видов используют различные репертуары специфических для сперматозоидов сигнальных молекул [174]. Активация сперматозоидов прогестероном, по-видимому, происходит по иному сигнальному пути в сперматозоидах мыши.

1.4.6. Существующие математические модели кальциевой регуляции подвижности сперматозоидов

Влияние кальциевого ответа на траектории сперматозоидов асцидий было рассмотрено в работе Kaupp et al. [32]. Было экспериментально показано, что на кривизну траекторий сперматозоида влияет не абсолютная концентрация ионов кальция, а усредненная для временного периода 0.2 секунды скорость изменения концентрации кальция $d[Ca^{2+}]_i/dt$. В данной работе был предложен следующий механизм модуляции кривизны жгутика сперматозоида $d[Ca^{2+}]_i/dt$.

Предполагалось, что в сперматозоиде присутствует несколько белков, связывающих кальций и контролирующих моторные белки аксонемы динеины, с различной кинетикой связывания кальция и ассиметрично расположенных в аксонеме.

Ассиметрия биения жгутика (С) предполагалась зависящей от разницы концентраций двух белков (V_1 и V_2) с одинаковой аффинностью к кальцию, но различной кинетикой его связывания.

$$C = \alpha \times ([CaV_1] - [CaV_2]) \quad (1)$$

Было показано, что при взятии в качестве V_1 и V_2 параметров для двух разных EF-ручек кальций-связывающего белка LC4, данная система могла работать как дифференциатор кальциевого сигнала для частот $0 < f < 6$ Гц.

Результирующая кривизна траектории сперматозоида в данной работе зависела от изменения концентрации кальция следующим образом:

$$\kappa_{\text{fit}}(t) = \kappa_1 + \beta \times dF_n/dt, \quad (2)$$

где dF_n/dt – производная по времени относительного изменения флуоресценции кальциевого зонда Fluo-4, связанного с кальцием, с помощью которого в статье производились измерения уровня кальция в сперматозоидах. Также в данной работе было показано, что уменьшение периода кальциевых осцилляций (а, соответственно, более частое изменение величины производной) может осуществлять переключение с продвижения на поисковое поведение.

В работе Olson et al. [31] посредством математического моделирования было рассмотрено влияние кальциевых осцилляций на траектории сперматозоида и также показано, что высокочастотные кальциевые осцилляции соответствуют более плотным траекториям сперматозоида и поисковому поведению вблизи яйцеклетки. Однако данная работа была также произведена для сперматозоидов беспозвоночных, а не млекопитающих.

При этом для сперматозоидов млекопитающих в существующих работах кривизна траекторий связывается с абсолютной концентрацией кальция, а не усредненной производной или частотой осцилляций; характерные концентрации кальция, контролирующие кривизну траекторий в литературе варьируются от 0.3 до 5 мкМ [106, 112]. Также в сперматозоидах асцидий характерные периоды кальциевых осцилляций составляют единицы секунд [32, 175], а в сперматозоидах млекопитающих может варьироваться от 30 до >300 секунд [176, 177], что может влиять на характер регуляции подвижности кальцием.

На настоящий момент существует ряд экспериментальных и теоретических моделей, связывающих кальциевый ответ в сперматозоидах млекопитающих с типом их подвижности [178, 179, 180]. В работе Olson et al. [180] движение жгутика сперматозоида человека в приближении эластичного

стержня было описано в зависимости от кальциевого ответа при гиперактивации сперматозоида. В данной работе зависимость кривизны жгутика сперматозоида предполагалась зависящей от концентрации кальция в приближении Михаэлиса-Ментен, и рассматривалась сравнительно небольшая часть траектории (85 секунд), сравнимая с периодом низкочастотных кальциевых осцилляций в сперматозоиде (>100 с) [176].

1.4.7. Существующие экспериментальные модели хемотаксиса нейтрофилов

Количественное изучение хемотаксиса нейтрофилов началось в 1987 году с определения человеческого гена, кодирующего CXCL8 [181]. Было показано, что активированные моноциты секретируют фактор, оказывающий специфическую хемоаттрактантную активность для нейтрофилов [181, 182]. Идентификация CXCL8 немедленно инициировала поиск его рецепторов и рецепторов для хорошо описанных классических хемоаттрактантов, включая формилированный бактериальный пептид fMLP и белок комплемента C5a [183].

Одним из наиболее широко используемых устройств для исследования хемотаксиса является "камера Бойдена" [184], разработанная в 1962 году, которая обычно используется для обнаружения хемотаксиса лейкоцитов и макрофагов. Однако камера Бойдена была непригодна для наблюдения за движениями отдельных клеток из-за нестабильных профилей химического градиента, а также затруднительного различения хемотаксиса и просто повышенной подвижности клеток. Для наблюдения миграции клеток в реальном времени исследователи разработали "камеру Цигмонда" [185] на основе камеры Бойдена, которая считается прототипом устройства, основанного на микрофлюидной технологии.

В последние годы благодаря развитию микрофлюидной технологии на микроскопическом уровне стали создаваться высококонтролируемые

химические градиенты [186]. За последнее десятилетие были разработаны различные конструкции микрофлюидных устройств для изучения хемотаксиса нейтрофилов в условиях потока жидкости и без его участия [187, 188, 189].

Однако было показано, что нейтрофилы очень чувствительны к сдвиговому напряжению и центрифугированию [22]. При этом большинство распространенных анализов используют выделенные из цельной крови нейтрофилы. Для дальнейшего упрощения экспериментального процесса и снижения повреждений, вызванных процессом выделения нейтрофилов, некоторые научные группы стремятся интегрировать модули выделения и исследования хемотаксиса в одном чипе или использовать сильно разбавленную цельную кровь [190, 191, 192]. Таким образом, микрофлюидные устройства для анализа хемотаксиса нейтрофилов непосредственно из цельной крови становятся основным направлением исследований в последнее время.

1.4.8. Математические модели хемотаксиса нейтрофилов

История моделирования хемотаксиса начинается с работ Патлака, Келлера и Сегеля [193]. Карл Пирсон ввел термин “случайное блуждание” почти полвека назад, поставив свою знаменитую проблему ходьбы пьяницы [194] при моделировании динамики популяции комаров, но Патлак попытался расширить теорию, включив в нее отсутствие независимости между последовательными шагами (чтобы хемотактирующая клетка какое-то время двигалась в заданном направлении) и влияние внешних факторов.

Первоначально модель Келлера и Сегеля предназначалась для описания макроскопических явлений: хемотаксиса и агрегации *Dictyostelium discoideum* [28] и формирования полос бактерий *Escherichia coli* [193]. В макроскопическом смысле хемотаксис вызывает рост популяции по градиентам концентрации и накопление в источниках аттрактантов.

Одновременно различные группы [27, 28, 29] формулировали «гибридные» модели: модели на основе агентов, соединенные с непрерывными уравнениями для химических веществ. Также на настоящий момент существует ряд моделей, описывающий хемотаксис нейтрофила как движение точечного агента [25, 26, 27]. Агентное моделирование нейтрофилов основывается на следующих принципах. Показано, что изменение занятости рецепторов по длине клетки (DFRO) является предиктором направленности движения клетки [26]. Вероятность того, что клетка ориентирована в сторону градиента или от него, является функцией DFRO [26]. Чем выше DFRO, тем более вероятно, что клетка будет совершать движение в согласии с направлением градиента концентрации хемоаттрактанта. Предполагается, что в течение одного временного шага нейтрофилы перемещаются с постоянной скоростью в направлении, которое они выбирают в начале временного шага в согласии с направлением градиента концентрации хемоаттрактанта.

Доля занятости рецепторов (FRO) в точке на поверхности клетки определяется как

$$FRO = \frac{C}{C+K_d}, \quad (3)$$

где C - концентрация хемоаттрактанта на поверхности, а K_d - константа диссоциации для взаимодействия хемоаттрактант-рецептор. DFRO по длине ячейки получается путем взятия градиента FRO и масштабирования по длине ℓ_C клетки [26].

$$DFRO = \frac{\ell_C}{K_d} \frac{dc}{dx} \frac{1}{(C/K_d+1)^2}, \quad (4)$$

где $\kappa = S_F DFRO$ – параметр, описывающий силу хемотактического сигнала.

В работе [26] клетки рассматриваются как имеющие ориентацию, которая попадает в распределение фон Мизеса – Фишера (колоколообразная кривая с максимумом в нуле и тем меньшей шириной кривой, чем больше аргумент функции).

Это используется для математического описания наблюдения, что более сильные сигналы градиента (то есть более высокий DFRO) заставляют ориентацию клеток с большей вероятностью смещаться в сторону направления градиента.

Распределение фон Мизеса – Фишера дается выражением:

$$f(\theta; \kappa) = \frac{\exp(\kappa \cos(\theta))}{2\pi I_0(\kappa)}, \quad (5)$$

где θ - угол, определяемый по отношению к направлению градиента хемоаттрактанта, а $I_0(\cdot)$ - модифицированная функция Бесселя порядка 0; $f(\theta; \kappa)$ используется здесь для представления двумерной миграции клеток [26].

Также для хемотактирующих клеток существует целый ряд работ, где для моделирования хемотаксиса используется так называемая Cellular Potts Model (также известная как CPM, или модель Glazier-Graner-Hogeweg), которая представляет клетки и среду как занимающие набор ячеек в решетке [25]. Случайная подвижность клеток моделируется как стохастическое изменение типа ячеек на границах контакта разных типов клеток и контакта клетка-среда. Конфигурации изменяются таким образом, чтобы минимизировать эффективную энергию системы, \mathcal{H} . Изменения в конфигурацию системы вносятся случайным образом. Любое случайное изменение может быть принято или отклонено, а изменение принимается с вероятностью, зависящей от $\Delta\mathcal{H}$ между новым и старым состоянием системы [25].

Таким образом, кальциевая регуляция подвижности жгутиковых и амёбоидных клеток млекопитающих влияет на широкий спектр биологических процессов — от оплодотворения до иммунного ответа. При этом на сегодняшний день остается ряд не до конца решенных вопросов о механизмах кальциевой регуляции актин- и жгутиково-опосредованной подвижности одиночных клеток млекопитающих. В случае сперматозоидов, отсутствие количественных данных об абсолютных $[Ca^{2+}]$, различия в сигнальных путях для сперматозоидов разных видов и пространственно-

временная сложность самой системы затрудняют построение универсальных моделей. В случае нейтрофилов, особенности активации нейтрофилов в условиях кровотока требуют разработки новых экспериментальных подходов и математических моделей.

Настоящая работа направлена на восполнение этих пробелов, объединяя эксперименты по флуоресцентной визуализации клеток в физиологических условиях и разработку комплексных моделей кальциевой сигнализации, что позволит глубже понять пути регуляции подвижности в немышечных клетках и открыть перспективы для дальнейших фундаментальных и прикладных исследований.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Материалы

Fura-2-AM (Molecular Probes, Eugene, OR); Fura-RED-AM (Molecular Probes, Eugene, OR); прогестерон, DMSO, CaCl₂, KCl, MgCl₂, NaH₂PO₄, NaHCO₃, БСА, Triton, EDTA, глюкоза (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), аспирин (Bayer, Germany), Источники материалов были следующими: Annexin V-Alexa Fluor 647 (BioLegend, Сан-Диего, Калифорния), DiOC-6, HEPES, бычий сывороточный альбумин, Hoechst-33342, поли-L-лизин, параформальдегид (PFA) и фосфатно-солевой буфер (PBS) (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури); фибриллярный коллаген типа I (Chrono-Log Corporation; Хавертаун, США); Аспирин (Bayer, Германия); Натализумаб (anti- $\alpha 4\beta 7$) (Hospira Inc, США); Cell Tracker Violet и вторичные антитела, конъюгированные с AlexaFluor 488 или AlexaFluor 568 (Invitrogen).

2.2. Методы

Анализ кальциевого ответа в сперматозоидах человека

Для исследования кальциевого ответа в сперматозоидах человека были использованы образцы спермы 10 взрослых нормозооспермных (по классификации Всемирной организации здравоохранения) доноров. Исследование одобрено этическим комитетом для клиники ЭКО AltraVita, решение № 6 от 12 января 2020 года, и оно было проведено в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации. Информированное согласие было получено от всех субъектов. Все добровольцы были проинформированы об использовании их клинических и биологических данных для экспериментов до того, как дали свое согласие. Для оценки параметров сперматозоидов применялись методы, рутинно используемые в клинике ЭКО АльтраВита.

Анализ концентрации и подвижности проводили с использованием камеры Маклера, а оценку морфологических характеристик - на

предварительно окрашенном (метиленовым синим и крезилфиолетовым) стекле по критериям Крюгера (количество нормальных сперматозоидов 60-150 млн/мл, не менее из них 70% подвижны (тип а+б) и не менее 13% имеют нормальную морфологию). Перед экспериментом сперматозоиды центрифугировали с использованием двухслойной системы AllGrad Wash и инкубировали в течение 3 ч в культуральной среде, забуференной бикарбонатом и HEPES, с 5% мас./об. HSA в плотно закрытых пробирках, как описано в [195], для индукции капацитации клеток. Для экспериментов по микроскопии очищенные от семенной жидкости сперматозоиды инкубировали с 2 мкМ Fura-RED, AM при +37⁰ в течение 40 минут.

Наблюдение активации клеток проводилось на микроскопе Nikon Eclipse TI-E. При работе на микроскопе смена окружения клеток проводилась путем откачивания перистальтическим насосом жидкости из проточной камеры (Рисунок 8). Для нанесения полилизина покровные стекла замачивались в 70%-ном водном растворе изопропанола на 30 минут, высушивались и очищались при помощи системы плазменной чистки. Сразу же после очистки на каждое стекло наносилось 30 мкл полилизина (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1 мг/мл. Затем стекла инкубировались в водяной бане в течение часа. Остатки полилизина смывались деионизированной водой. Далее стёкла высушивались при температуре 37⁰.

Адгезия клеток и их подвижность контролировались при помощи микроскопии дифференциального интерференционного контраста. Для сперматозоидов, окрашенных 1 мкМ Fura Red, возбуждение флуоресценции проводилось лазером на длинах 405 и 488 нм для несвязавшейся и связавшейся с кальцием красок соответственно. Регистрация относительного изменения флуоресценции красителя проводилась на длинах волн 510-550 нм.

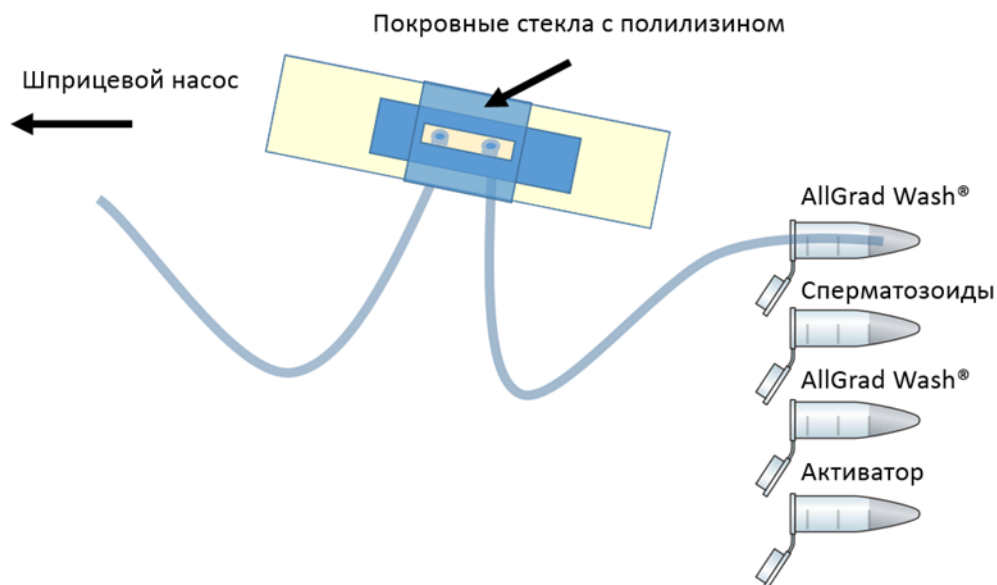


Рисунок 8 – Наблюдение кальциевой активации сперматозоидов. Для наблюдения кальциевой активации сперматозоидов и смены растворов использовался метод проточных камер. Адаптировано из [141]

Для окрашенных Fura Red клеток далее проводился пересчёт относительного изменения флуоресценции в концентрации кальция по следующей формуле [196]:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \frac{F_{488\text{max}} - F_{488\text{back}}}{F_{488\text{min}} - F_{488\text{back}}} \left(\frac{R - R_{\text{min}}}{R - R_{\text{max}}} \right), \quad (6)$$

где K_d – константа диссоциации комплекса кальция и Fura Red, R – отношение интенсивности флуоресценции при возбуждении лазером с длиной волны $\lambda=405$ нм (связавшейся с кальцием краски) к интенсивности флуоресценции при $\lambda = 488$ нм (не связавшейся с кальцием краски). $F_{488\text{max}}$ и $F_{488\text{min}}$ – отношение максимальной возможной флуоресценции при возбуждении флуоресценции лазером с длиной волны $\lambda = 488$ нм, $F_{488\text{back}}$ – интенсивность фона. R_{min} и R_{max} – отношения интенсивностей при максимально и минимально возможных концентрациях кальция в клетке.

Для определения данных коэффициентов R_{min} и R_{max} были проведены калибровочные эксперименты: для измерения максимально возможного отношения флуоресценций R_{max} к сперматозоидам, разведенным в буфере

SpermWash и инкубированным с Fura Red по приведенному выше протоколу, добавлялся ионофор A23187, способствующий входу ионов кальция в клетку. Его финальная концентрация в растворе составляла 5 мМ.

Для того, чтобы измерить R_{\min} , после проведения предыдущих измерений флуоресценции в среду с клетками добавлялся кальциевый хелатор EGTA в концентрации 4 мМ, и проводилась инкубация клеток в течение 10 минут при комнатной температуре.

Анализ кальциевого ответа в сперматозоидах мыши

Данное исследование было одобрено комиссией по биоэтике МГУ им. М.В. Ломоносова (номер заявки 109-ж от 06 марта 2022 года), и оно было проведено в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации. У умерщвленных методом цервикальной дислокации мышей вырезался придаток яичка. Производилось несколько глубоких надрезов на придатке яичка, далее в течение десяти минут сперматозоидам позволялось выплыть наружу. С краев капли собиралось 10 мкл буфера, содержащего сперматозоиды, далее сперматозоиды разбавлялись буфером Tyrode's (NaCl 134 мМ, KCl 2.68 мМ, CaCl₂ 1.8 мМ, MgCl₂ 1.05 мМ, NaH₂PO₄ 417 мкМ, NaHCO₃ 11.9 мМ, глюкоза 5.5 мМ). После добавления Fura 2 в концентрации 2 мкМ производилась инкубация при 37°C в течение 45 минут. Далее капли буфера объемом 100 мкл наносились на чашку Петри, и через десять минут 10 мкл буфера со сперматозоидами собиралось с краю капли и ресуспендировалось в 90 мкл Tyrode's без добавления кальция на каплю.

Экспериментальное наблюдение прогестероновой активации окрашенных флуоресцентной меткой на кальций Fura 2 мышинных сперматозоидов производилось с помощью спектрофлуориметра. Возбуждение Fura 2, не связавшейся с кальцием, производилось на длине волны 380 нм, возбуждения Fura 2, связавшейся с кальцием, производилось на длине волны 340 нм. В ходе измерений в суспензию клеток добавлялся CaCl₂

до концентрации 2 мМ для определения базового уровня сигнала [197]. Далее в суспензию добавлялся прогестерон в концентрации 50 мкМ. В части экспериментов перед добавлением прогестерона сперматозоиды инкубировались с аспирином в концентрации 100 нг/мл в течение пяти минут. Аспирин в высокой дозе добавлялся для уточнения предложенной схемы активации сперматозоидов мыши прогестероном, так как в данном случае он является ингибитором обеих изоформ циклооксигеназы [198]. Для окрашенных Fura 2 клеток далее проводился пересчёт относительного изменения флуоресценции в концентрации кальция по формуле, аналогичной формуле (6), где K_d – константа диссоциации комплекса кальция и Fura 2, R – отношение интенсивности флуоресценции при возбуждении лазером с длиной волны $\lambda=340$ нм (связавшейся с кальцием краски) к интенсивности флуоресценции при $\lambda=380$ нм (не связавшейся с кальцием краски). F_{max} и F_{min} – максимальная и минимальная флуоресценции при возбуждении данной длиной волны, F_{back} – флуоресценция фона. R_{min} и R_{max} – отношения интенсивностей при максимально и минимально возможных концентрациях кальция в клетке. Для определения данных коэффициентов R_{min} и R_{max} была проведена следующая калибровка: для измерения максимально возможного отношения флуоресценций R_{max} к сперматозоидам в конце каждого эксперимента добавлялся детергент Triton. Для того, чтобы измерить R_{min} , после добавления Triton в среду с клетками добавлялся кальциевый хелатор EDTA. После каждого добавления подвижность и морфология сперматозоидов в суспензии проверялась на микроскопе ЛОМО Микмед-6 в режиме темного поля.

Построение модели кальциевого ответа в сперматозоидах человека

Для сперматозоидов человека нами были разработаны две вычислительные модели (гомогенная и трехмерная) для изучения индуцированной прогестероном активации сперматозоидов человека.

Гетерогенная (трехмерная, 3D) модель была построена автоматически в программе VCell[199] на основе трехмерной структуры сперматозоида человека и набора биохимических реакций, лежащих в основе активации сперматозоида. Потоки для биохимических реакций рассчитывали на основе законов химической кинетики (закон действующих масс, кинетика Генри-Михаэлиса-Ментен или функции Хилла). Параметры уравнений были взяты из литературы (таблицы П.1, П.2). Полная модель представляет собой набор из 19 дифференциальных уравнений и 52 параметров, 47 из которых взяты из литературы.

Гетерогенная модель была построена по модульному принципу (Рисунок 7). Первый модуль состоял из канала CatSper, его активаторов и ингибиторов. Модуль имитировал динамику открытия CatSper при активации сперматозоидов прогестероном (Рисунок 7А). Вторым модулем (Рисунок 7Б) описывал концентрацию ионов кальция в сперматозоиде, а также на динамике диффузии и концентрации IP_3 . Диффузию IP_3 , кальция и кальциевых буферов учитывали по закону Фика. Некоторые реакции были ограничены специфическими участками сперматозоидов; например, генерация IP_3 с помощью PLC происходила только в шейке и головке сперматозоиде.

Гомогенная (0D) модель сперматозоида была основана на предположении о хорошем перемешивании белков во всех компартментах модели. Гомогенная модель была построена автоматически в программе COPASI [200] на основе объемов компартментов сперматозоида, рассчитанных для 3D-модели и того же набора биохимических реакций, лежащих в основе активации клетки, что и гетерогенная модель.

Построение модели кальциевого ответа в сперматозоидах мыши

Для сперматозоидов мыши нами также были разработаны две вычислительные модели (гомогенная и трехмерная). Полная модель

представляет собой набор из 23 дифференциальных уравнений и 49 параметров, 43 из которых взяты из литературы.

Гетерогенная модель была построена по модульному принципу. Первый модуль описывал сигнальный каскад, приводящий к активации PLC β , после активации сперматозоидов прогестероном. Второй модуль описывал концентрацию ионов кальция в сперматозоиде, а также на динамике диффузии и концентрации IP₃.

Построение гомогенной и трехмерной модели проводилось по принципу, аналогичному таким моделям кальциевой сигнализации в сперматозоидах человека.

Построение модели влияния кальциевого ответа на подвижность сперматозоидов

Для прогнозирования траекторий модели сперматозоидов по кальциевому ответу мы объединили нашу ранее опубликованную модель прогестерон-индуцируемой кальциевой сигнализации в сперматозоиде человека[177] с моделью хемотаксиса сперматозоидов Kaupp et al[32].

Кальциевый ответ в сперматозоиде человека в ответ на стимуляцию прогестероном был получен из трехмерной модели кальциевого ответа в сперматозоидах человека[177] путем усреднения концентрации кальция по объему цитозоля. К полученному с помощью математической модели сигнала добавлялся случайный шум. Величина шума рассчитывалась следующим образом. Сначала для каждой временной точки выбиралось случайное значение r в диапазоне $(-r_{\max}, r_{\max})$ с использованием равномерного случайного распределения. Значение сигнала в данный момент времени умножалось на r , и значение шума добавлялось к значению сигнала в данный момент времени. Значение r варьировалось в диапазоне от 0.001 до 0.1 для определения надежности модели.

После этого концентрацию кальция C нормировали на равновесное значение кальция для модели ($[Ca^{2+}] = 100$ нМ) и рассчитывали нормированную концентрацию кальция C_n :

$$C_n = \frac{C - Ca_0^{2+}}{Ca_0^{2+}} \quad (7)$$

Чтобы восстановить траекторию сперматозоида по скорости и сигналам Ca^{2+} , в уравнение (1) подставлялась производная $\frac{dC_n}{dt}$. Значение $\frac{dC_n}{dt}$ было получено путем численного дифференцирования и усреднено во временном окне 0,2 секунды (аналогично работе Каурр et. al[32]). Диапазон значений $\beta = 0.04 \pm 0.03$ с/мкм был получен из этой же работы. На основе полученной производной вычислялась кривизна траектории следующим образом:

$$\kappa_{fit}(t) = \kappa_1 + \beta \frac{dC_n}{dt} \quad (8)$$

Следует отметить, что в отличие от сперматозоидов морских беспозвоночных, рассматриваемых в статье Каурр et al.[32], неактивированные сперматозоиды человека имеют тенденцию плавать по прямым линиям[53], поэтому в этой работе κ_1 было установлено равным нулю. При этом показано[179], что в субпопуляции сперматозоидов, не демонстрирующих динамического кальциевого сигнала, отличного от шума относительно базовой линии, траектории близки к движению по кругу, но неизвестно, связано это с κ_1 , отличным от нуля, или указывает на какие-то дефекты данной группы клеток, например, нарушение гликилирования тубулинов микротрубочек[53].

Также нами был исследован вариант модели, в котором кривизна траектории рассчитывалась исходя из абсолютной концентрации кальция:

$$\kappa_{fit}(t) = \kappa_1 + \beta \frac{C}{K_{Ca} + C} \quad (9)$$

Для обоих вариантов модели траектория была восстановлена по кривизне κ и смещению сперматозоида ($s = v_{max} \times \Delta t$) путем численного интегрирования двумерных уравнений Френе – Серре[32] методом Эйлера с

использованием Python 3.8. Значения β , v_{\max} и r_{\max} варьировались для проверки надежности модели.

Наблюдение хемотаксиса и кальциевой сигнализации нейтрофилов вокруг растущего тромба

Наблюдение за поведением нейтрофилов проводилось в плоско-параллельной проточной камере. Цельную кровь предварительно окрашивали DiOC6, Hoechst 33342 и Annexin V-Alexa647. Кровь перфузировали через плоско-параллельные проточные камеры со скоростью сдвига 100 c^{-1} по покрытой коллагеном I типа поверхности. Рост тромба и ползание лейкоцитов наблюдали в режиме эпифлуоресценции с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti-E.

Для наблюдения кальциевого ответа в нейтрофилах, хемотактирующих около растущего тромба, использовался флуоресцентный маркер Fura-Red. Кровь преинкубировалась с Fura-Red в концентрации $1 \text{ }\mu\text{M}$ в течение 40 минут при 37° и далее перфузировалась через плоско-параллельные проточные камеры со скоростью сдвига 100 c^{-1} по покрытой коллагеном поверхности. Наблюдение кальциевого ответа в хемотактирующих нейтрофилах производилось с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti2 в режиме конфокальной съемки.

Модель распределения хемоаттрактанта около растущего тромба представляла собой систему дифференциальных уравнений в частных производных, интегрировавшихся в программе COMSOL Multiphysics методом конечных объёмов. Уравнения модели основаны на уравнениях Навье-Стокса для ламинарного потока и законе Фика.

Модель роста ламеллиподии и модель движения нейтрофила в поле хемоаттрактанта представляли собой систему стохастических уравнений, интегрируемых с помощью Python 3.8.

Параметры моделей были либо взяты из литературных источников, либо подобраны на основании доступных из литературы данных или же данных, полученных экспериментально в рамках диссертационной работы. Полученные с помощью моделей предсказания проверяются экспериментально или на основе литературных данных.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8 (<https://www.graphpad.com/>). Данные были представлены в виде среднего, по меньшей мере, 3 повторных измерений \pm стандартное отклонение (SD), если не указано другое. Нормальность распределения данных определяли с помощью теста Уилкоксона. При $p < 0,05$ считалось, что выборка имеет нормальное распределение. Для сравнения выборок использовали U-критерий Манна-Уитни и парный t-критерий Стьюдента. Корреляцию между данными оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмана. Различия считали статистически достоверными при $p < 0.05$.

Глава 3. Результаты

3.1. Хемотаксис нейтрофилов вблизи растущего тромба

3.1.1. Анализ движения нейтрофилов в проточной камере

С помощью флуоресцентной микроскопии нами были получены изображения нейтрофилов и тромбоцитов в плоско-параллельной камере. Таким образом мы могли отследить площадь растущего тромба, скорость движения нейтрофила и траекторию его движения. Нами было проанализировано экспериментально наблюдаемое движение нейтрофилов здоровых доноров вокруг растущего тромба на подложке из фибриллярного коллагена. Расстояние между центрами нейтрофилов и краем ближайшего тромба было сравнено с расстоянием между тромбами и такими расстояниями для случайно сгенерированной траектории (Рисунок 9).

Для всех подвижных нейтрофилов от каждого донора было определено расстояние (r_{exp}) между геометрическим центром нейтрофила и ближайшим краем тромба (Рисунок 11А), и для каждой клетки было рассчитано среднее значение (Рисунок 9). В качестве контроля мы сгенерировали случайную траекторию с той же длиной и скоростью, что и экспериментальная, начиная траекторию со случайной точки на поле зрения, и рассчитали расстояние (r_{rand} , Рисунок 11А) от этой случайной траектории до ближайшего края тромба.

Примечательно, что у здоровых доноров траектории реальных нейтрофилов были значительно ближе к тромбам, чем случайные траектории, для 5 из 6 здоровых доноров (Рисунок 9). Это указывает на то, что нейтрофилы стремятся располагаться ближе к тромбам. Однако объяснением также может то, что как тромбоциты, так и нейтрофилы могут просто прикрепляться к областям с более высокой плотностью коллагена.

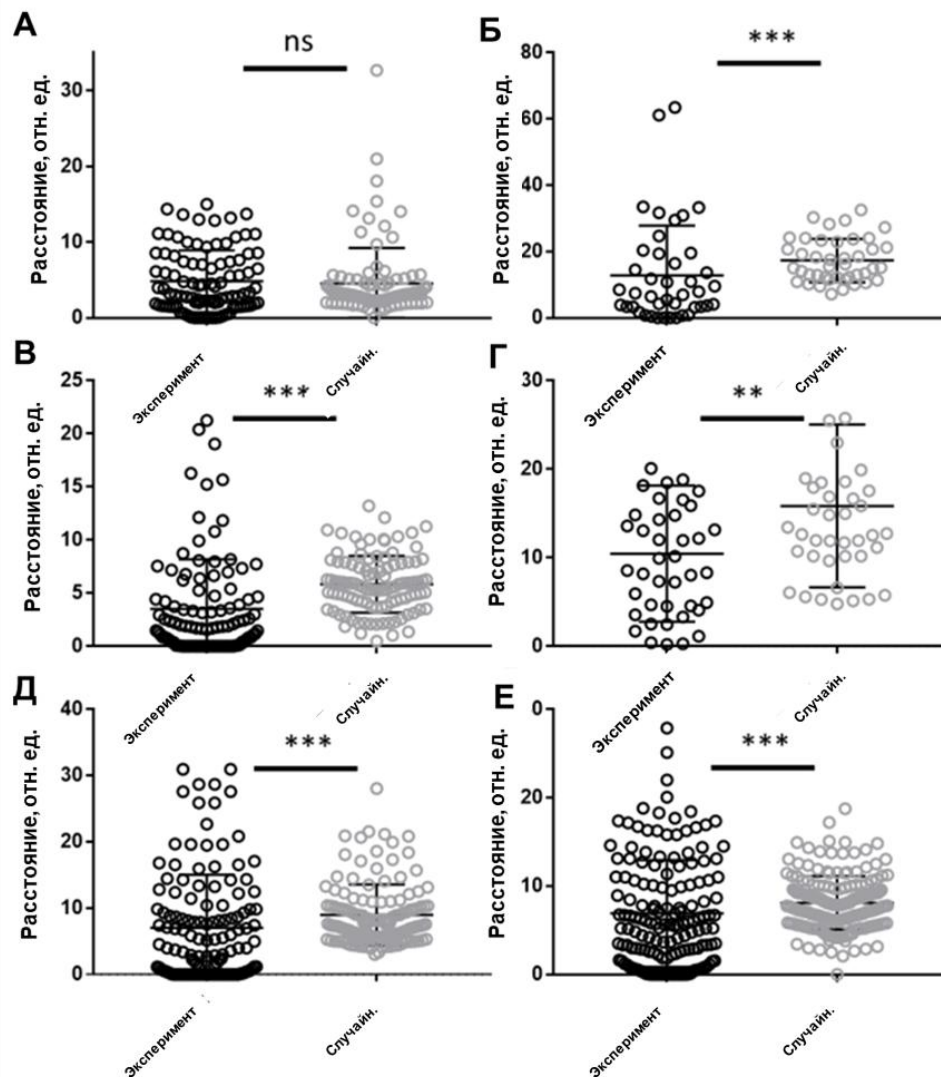


Рисунок 9 – Расположение нейтрофилов здоровых доноров относительно тромба. Расстояние от ближайшего края тромба до центров нейтрофилов существенно меньше по сравнению с расстоянием от границы тромба до случайных траекторий у здоровых доноров в 5 из 6 случаев. А-Е изображает 6 разных здоровых доноров. * соответствует $p < 0,05$; ** соответствует $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Статистическую значимость определяли с помощью критерия Манна-Уитни

Тот же анализ был проведен для образцов крови от пациентов с синдромом Швахмана-Даймонда (СШД). Оказалось, что средние скорости нейтрофилов были значительно ниже (Рисунок 10) по сравнению со здоровыми донорами, хотя образование тромба в образцах СШД было снижено только через 25 минут эксперимента (Рисунок 10), что указывает на то, что замедление не связано с дефектной секрецией хемоаттрактанта

тромбоцитами пациентов с СШД. Известно, что линейные скорости, связанные со случайным движением, но не скорости хемотаксиса, остаются неизменными у пациентов с СШД.

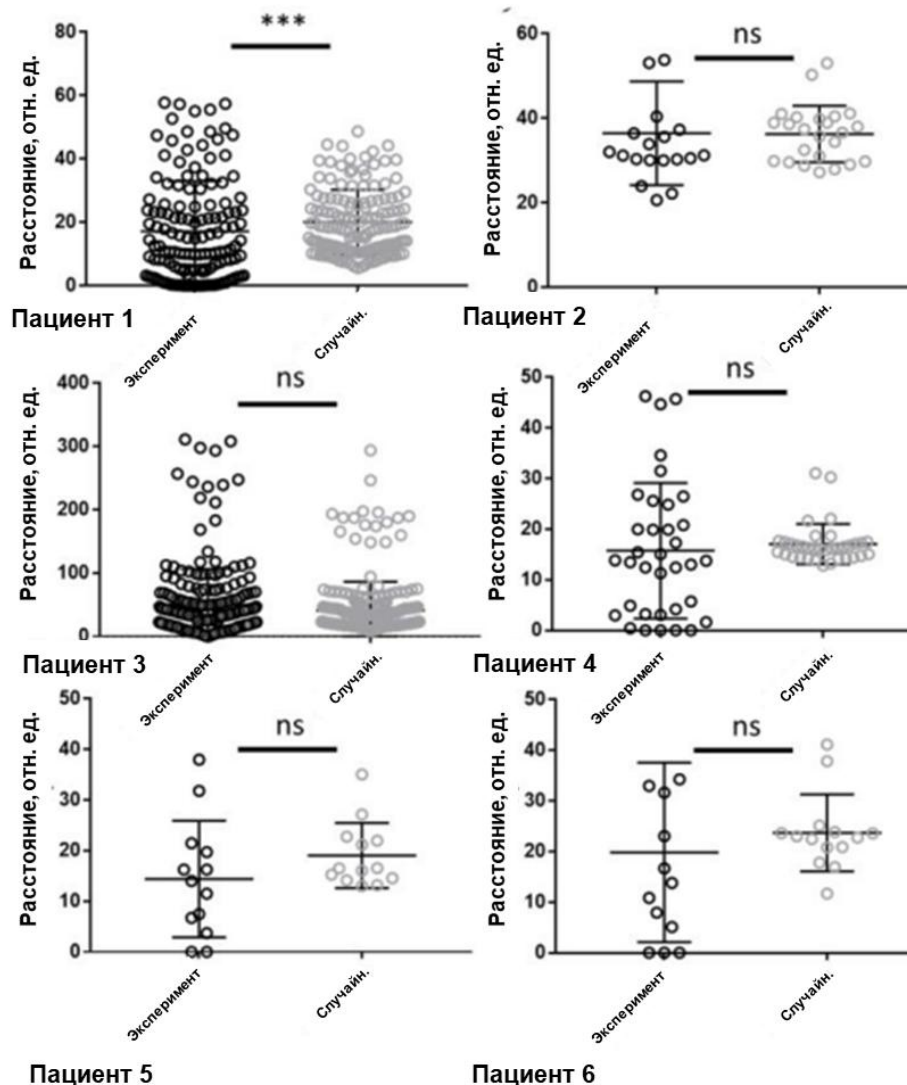


Рисунок 10 – Расположение нейтрофилов пациентов с СШД относительно тромба. Расстояние от ближайшего края тромба до центров нейтрофилов статистически не отличается от расстояния от границы тромба до случайных траекторий у пациентов с СШД в 5 из 6 случаев. Изображено 6 разных здоровых доноров. * соответствует $p < 0,05$; ** соответствует $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Статистическую значимость определяли с помощью критерия Манна-Уитни

Мы также провели подобный анализ расположения нейтрофилов СШД относительно тромбов. Интересно, что нейтрофилы у пациентов с СШД имеют тенденцию двигаться вдоль потока (Рисунок 12Б). Расстояние между

нейтрофилами и ближайшим краем тромба у пациентов с СШД не показывало статистически значимой разницы со случайным распределением у всех пациентов, кроме пациента 1. Это был единственный пациент, у которого были нормальные уровни нейтрофилов и тромбоцитов, хотя линейная скорость нейтрофилов у этого пациента все равно была снижена (Рисунок 12E). Интересно, что, хотя у некоторых других пациентов была нормальная площадь тромба (пациент 2), нормальное или повышенное количество нейтрофилов (пациент 3) или нормальная линейная скорость нейтрофилов (пациент 6), для них экспериментальное расстояние между нейтрофилами и ближайшим краем тромба все равно не было меньше случайного.

В отличие от здоровых доноров, нейтрофилы у пациентов с СШД не предпочитают двигаться против потока. Отсутствие ориентации против потока и к со-локализации с тромбами у нейтрофилов СШД может быть связано с их нарушенным хемотаксисом.

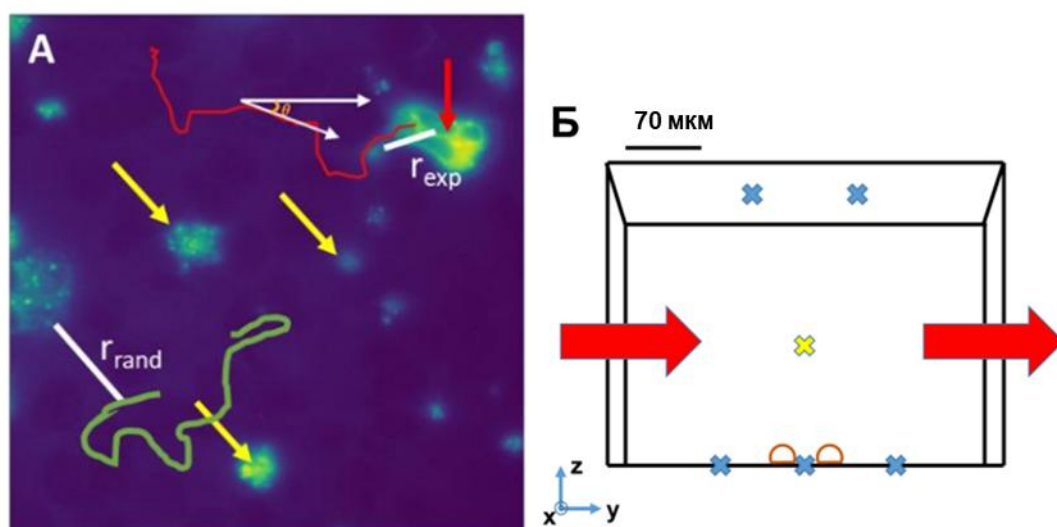


Рисунок 11 – Параметры проточных камер. А. Экспериментальная траектория нейтрофила отмечена красной линией. Белая стрелка обозначает направление потока. θ - угол между направлением движения нейтрофилов и направлением потока. Случайная траектория отмечена зеленой линией. Красная стрелка отмечает нейтрофил. Желтая стрелка обозначает местоположение тромба. γ_{rand} и γ_{exp} обозначают случайно сгенерированное и экспериментальное расстояние от края растущего тромба до нейтрофила, соответственно. Б. Рассматриваемая область проточной камеры. Направление потока показано красными стрелками. Граничные условия Дирихле отмечены синими крестиками. Периодические граничные условия отмечены желтым крестиком. Масштаб по z не сохранен

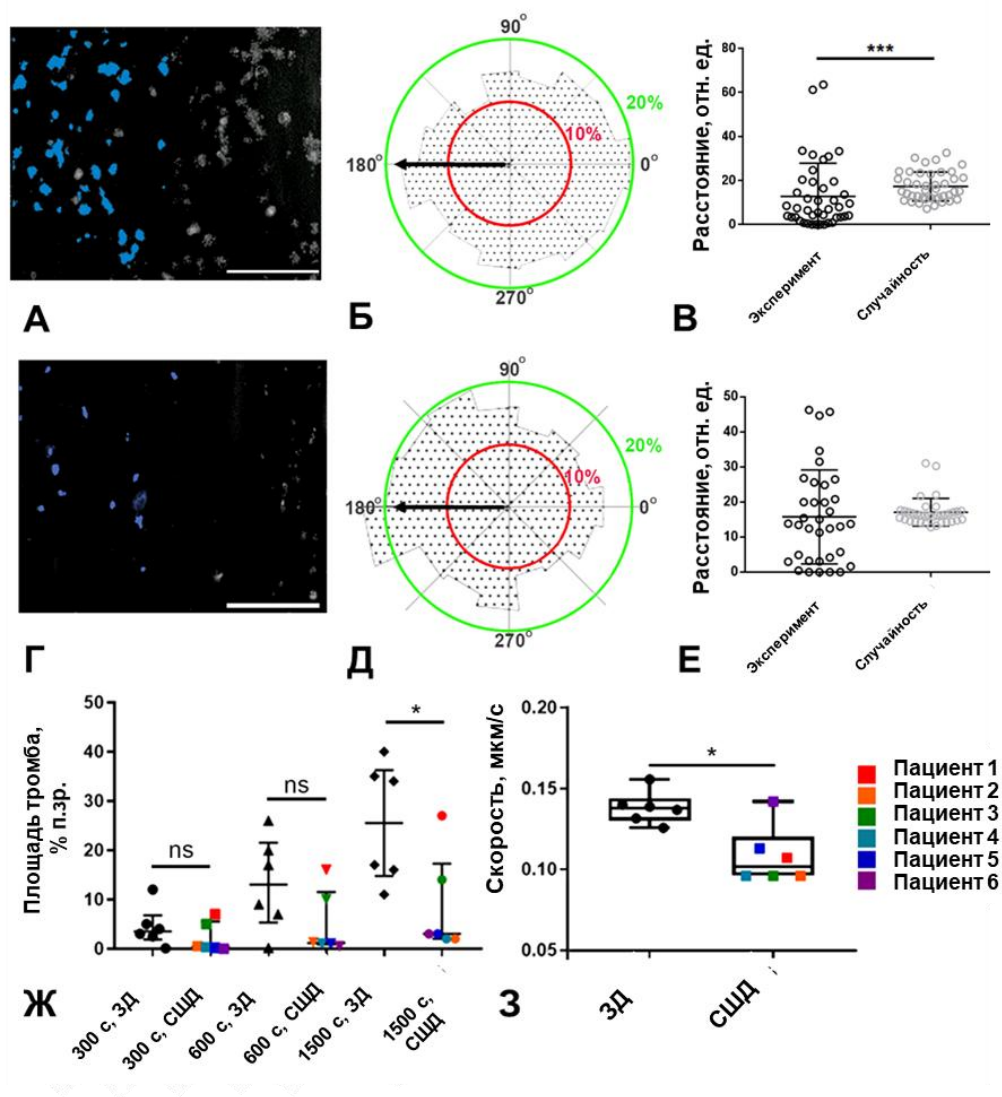


Рисунок 12 – Анализ движения нейтрофилов вокруг растущего тромба. А. Типичный вид микроскопического изображения роста тромбов на коллагеновой подложке у типичного здорового донора. Серый – окраска нейтрофилов и растущего тромба DiOC-6, синий – пример сегментации тромбов. Б. Гистограмма направлений движения нейтрофилов (θ) для здоровых доноров. Черная стрелка указывает направление потока. У здоровых доноров ($n = 6$) нейтрофилы преимущественно двигаются против потока. В. Экспериментально измеренное расстояние от ближайшего края тромба до центра нейтрофила значительно меньше по сравнению с расстоянием от края тромба до случайно расположенного круга размером с нейтрофил. Репрезентативная гистограмма для одного здорового донора. Г. Репрезентативное микроскопическое изображение роста тромбов, вызванного коллагеном, у пациента с СШД. Серый – DiOC-6, синий – пример тромбов. Д. Гистограмма направлений движения нейтрофилов у пациентов с СШД. Черная стрелка указывает направление потока. Е. Расстояние от ближайшего края тромба до центра нейтрофила не отличается значительно от расстояния до точек случайной траектории. Пациент №4. Ж. Площади тромбов у здоровых контролей и пациентов с СШД. После 1500 секунд тромбы у пациентов значительно меньше, чем у тромбов здоровых доноров. З. Средние скорости движения нейтрофилов у пациентов с СШД значительно ниже, чем у здоровых доноров. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$. Статистическая значимость рассчитана с помощью теста Манна-Уитни

Ориентация движения нейтрофилов рассчитывалась следующим образом: 60 траекторий нейтрофилов случайным образом были выбраны от каждого донора, для каждой траектории временные точки продублированы, чтобы суммарная длина составляла не менее 250 секунд.

3.1.2. Влияние параметров потока на характер движения нейтрофилов вокруг растущего тромба

Для того чтобы исследовать роль потока крови в движении нейтрофилов, мы сравнили скорости нейтрофилов, площадь тромбов и количество прикрепленных нейтрофилов для диапазона значений пристеночной скорости сдвига, μ : 100 c^{-1} , 200 c^{-1} , 300 c^{-1} , 500 c^{-1} (Рисунок 13,14).

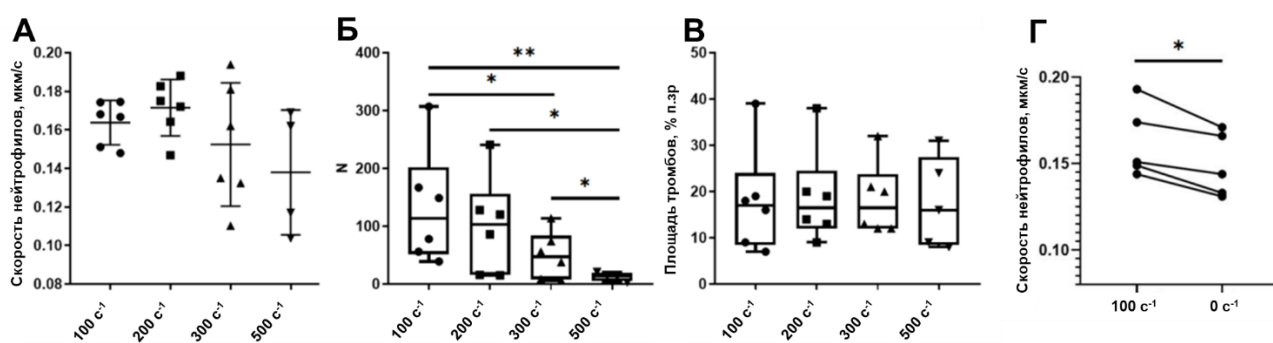


Рисунок 13 – Параметры тромбовоспаления при различных скоростях сдвига. (А) Средние скорости движения нейтрофилов здоровых доноров не зависели от потока ($n = 6$). (Б) Количество адгезировавших нейтрофилов за эксперимент значительно снижалось при увеличении скорости потока ($n = 6$). (В) Площадь тромба не зависела от потока ($n = 6$). * соответствует $p < 0,05$; ** соответствует $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Статистическая значимость определялась с использованием критерия Манна-Уитни. (Г) Нейтрофилы значимо замедляются при остановке потока. $n = 5$. * - соответствует $p < 0,05$. Для расчета статистической значимости использовался парный t-критерий

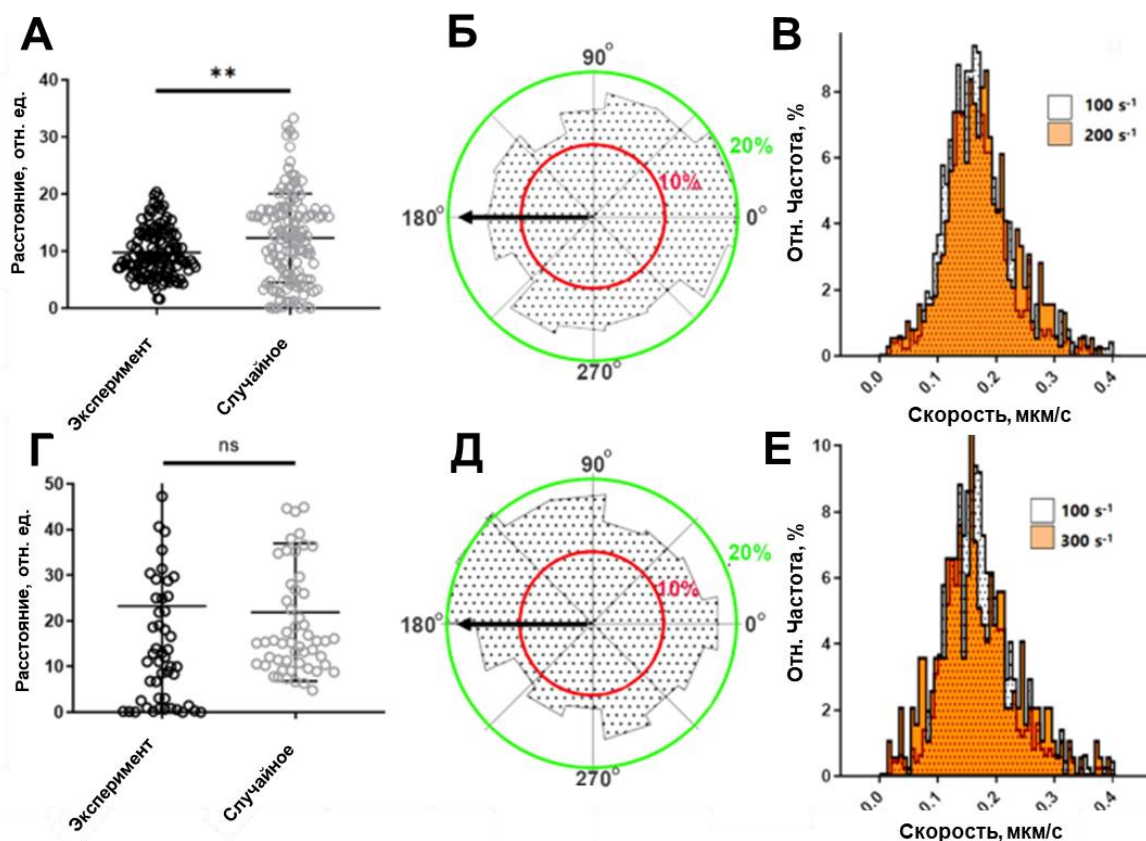


Рисунок 14 – Влияние потока на адгезию и хемотаксис нейтрофилов. (А) Расстояние от ближайшего края тромба до центров нейтрофилов значительно меньше случайного при значении скорости сдвига 200 с^{-1} для 3 из 6 экспериментов. Типичный эксперимент из $n = 6$. (Б) Гистограмма направлений движения нейтрофилов для $\mu = 200 \text{ с}^{-1}$. Черная стрелка указывает направление потока. Нейтрофилы преимущественно движутся против потока. (В) Распределение скоростей нейтрофилов для $\mu = 200 \text{ с}^{-1}$ и $\mu = 100 \text{ с}^{-1}$. Различий в распределении скоростей нейтрофилов не наблюдается. (Г) Расстояние от ближайшего края тромба до центров нейтрофилов достоверно не отличается от расстояния от границы тромба до случайных траекторий при значении скорости сдвига 300 с^{-1} . Типичный эксперимент из $n = 6$. (Д) Гистограмма направлений движения нейтрофилов при значении скорости сдвига 300 с^{-1} . Черная стрелка указывает направление потока. При $\mu = 300 \text{ с}^{-1}$ нейтрофилы преимущественно движутся вдоль потока. (Е) Распределение скоростей нейтрофилов при $\mu = 300 \text{ с}^{-1}$ и $\mu = 100 \text{ с}^{-1}$. Несколько субпопуляций скоростей появляются при $\mu = 300 \text{ с}^{-1}$. * соответствует $p < 0,05$; ** соответствует $p < 0,01$; *** соответствует $p < 0,001$. Статистическая значимость рассчитывалась с использованием критерия Манна–Уитни

Хотя все наблюдаемые параметры тромбовоспаления, кроме количества адгезировавших клеток, не зависели от скорости сдвига (Рисунок 14 А-В), примечательно, что при только при $\mu = 100 \text{ с}^{-1}$ нейтрофилы предпочитали располагаться близко к тромбам (5 из 6 проанализированных здоровых контроля для 100 с^{-1} против 3 из 6 для 200 с^{-1} и 1 из 6 для 300 с^{-1}) и были преимущественно ориентированы против потока (Рисунок 12Б,В).

При $\mu = 300 \text{ c}^{-1}$ и выше, большинство клеток испытывало роллинг (Рисунок 14Д), на что также указывало появление нескольких субпопуляций скоростей клеток (Рисунок 14Е). Две субпопуляции со скоростями ниже и выше среднего пика могли соответствовать случайно движущимся нейтрофилам и нейтрофилам, демонстрирующим роллинг на значительной части своих траекторий, соответственно. Интересно, что когда кровоток был остановлен после 10 минут перфузии, средние скорости нейтрофилов снизились, а предпочтительное направление движения против потока исчезло (Рисунок 13Г).

Таким образом, сильный поток крови препятствует адгезии нейтрофилов, но он также приносит новые тромбоциты, которые при адгезии к тромбу и активации могут секретировать хемоаттрактант, заставляющий нейтрофилы двигаться против потока.

3.1.3. Влияние различных подложек на рост тромба и движение нейтрофилов в проточной камере

Также мы провели эксперименты, в которых тромбообразование происходило на других белках крови — фибриногене, фибронектине и факторе Виллебранда (Рисунок 15). Поскольку во всех случаях образовавшиеся тромбы были неотличимы от отдельных адгезировавших тромбоцитов (Рисунок 15), расстояния от клеток до тромбов рассчитать не удалось. Ни один из использованных белков не мог поддерживать движение нейтрофилов против потока. Для фактора Виллебранда и фибриногена наблюдался преимущественно роллинг, а для фибронектина скорости движения клеток были снижены. Это указывает на необходимость наличия полноценного растущего тромба для обеспечения движения нейтрофилов против потока.

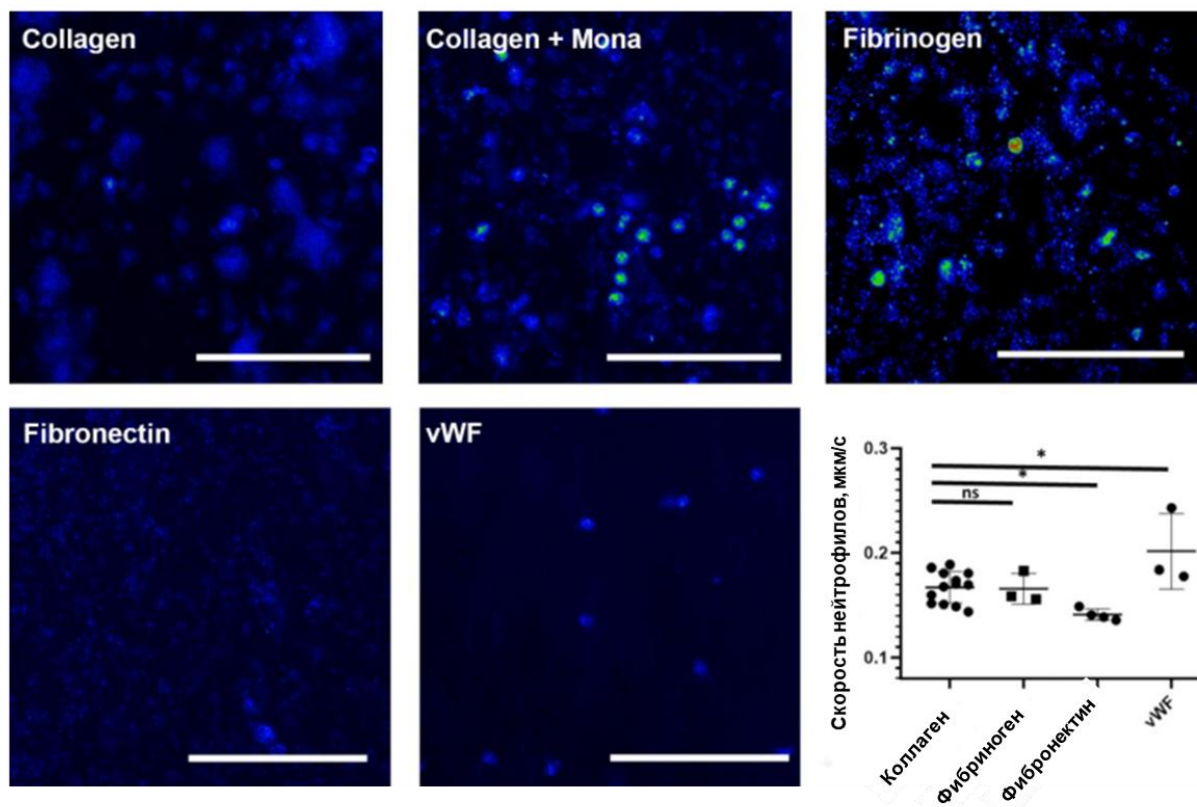


Рисунок 15 – Тромбовоспаление на различных подложках. Вид тромбов и скорость движения нейтрофилов для здоровых добровольцев ($n = 4$) в проточных камерах для различных подложек. Масштабный отрезок 30 мкм. Collagen – коллаген. Collagen + Mona – коллаген + монафрам. Fibrinogen – фибриноген. Fibronectin – фибронектин. vWF – фактор Виллебранда

3.1.4. Вклад компонентов крови в движение нейтрофилов вокруг растущего тромба

Для того чтобы уточнить механизмы адгезии нейтрофилов к растущим тромбам, мы удалили плазменные белки из цельной крови с помощью последовательного центрифугирования. В такой «чистой» системе не наблюдалось ползания гранулоцитов по коллагеновой подложке (Рисунок 16А), хотя наблюдалось кратковременное прикрепление нейтрофилов к покрытой тромбоцитами поверхности и качение гранулоцитов на 6 мкм выше слоя коллагена (Рисунок 16Б). Добавление 10% физиологических концентраций фибриногена и фактора фон Виллебранда привело к восстановлению ползания гранулоцитов (Рисунок 16В, Г) по покрытому коллагеном стеклу, однако гранулоциты спускались с тромбов менее легко, чем в цельной крови (Рисунок 16Д, Е).

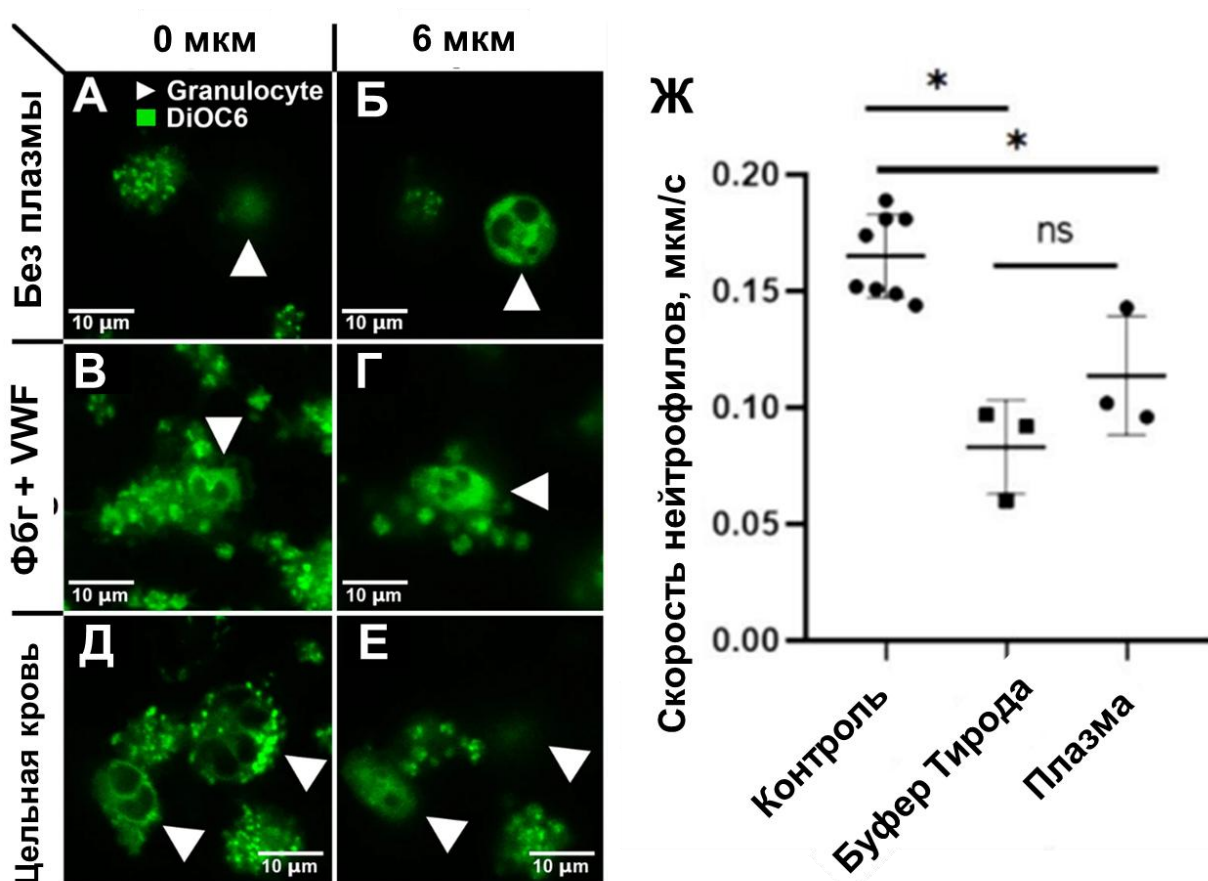


Рисунок 16 – Вклад компонентов крови в движение нейтрофилов вокруг тромба. (А, Б) Тромбы в “чистой системе” без плазмы на уровне коллагена (А) и на высоте 6 мкм над коллагеном (Б). (В,Г) Тромбы в “чистой системе” без плазмы с добавлением фибриногена и VWF на уровне коллагена (В) и на высоте 6 мкм над коллагеном (Г). Тромбы в цельной крови на уровне коллагена (Д) и на высоте 6 мкм над коллагеном (Е). Типичные изображения из $n = 10$ экспериментов. (Ж) Скорости движения нейтрофилов для различных экспериментальных постановок. * соответствует $p < 0,05$; ** соответствует $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Статистическая значимость определялась с использованием критерия Манна-Уитни

Для оценки влияния клеточных компонентов крови на движение нейтрофилов мы провели эксперименты с полным удалением тромбоцитов или эритроцитов или заменой цельной крови после 10 мин перфузии либо на буфер Тирода с кальцием, либо на бедную тромбоцитами плазму. В случае отсутствия эритроцитов, не наблюдалось тромбов или нейтрофилов (данные не показаны). Во втором случае подвижность нейтрофилов значительно снизилась, (Рисунок 16Г) и в случае, когда мы продолжали перфузию буфером

Тирода без кальция, и когда мы продолжали перфузию плазмой. Это указывает на то, что уже выросшие тромбы переставали привлекать нейтрофилы.

3.1.5. Адгезия нейтрофилов к подложке и к тромбу происходит интегрин- и кальций-зависимым образом

Также мы провели эксперименты по наблюдению за тромбовоспалением в присутствии ингибиторов адгезии: Ведолизумаба и Монафрама.

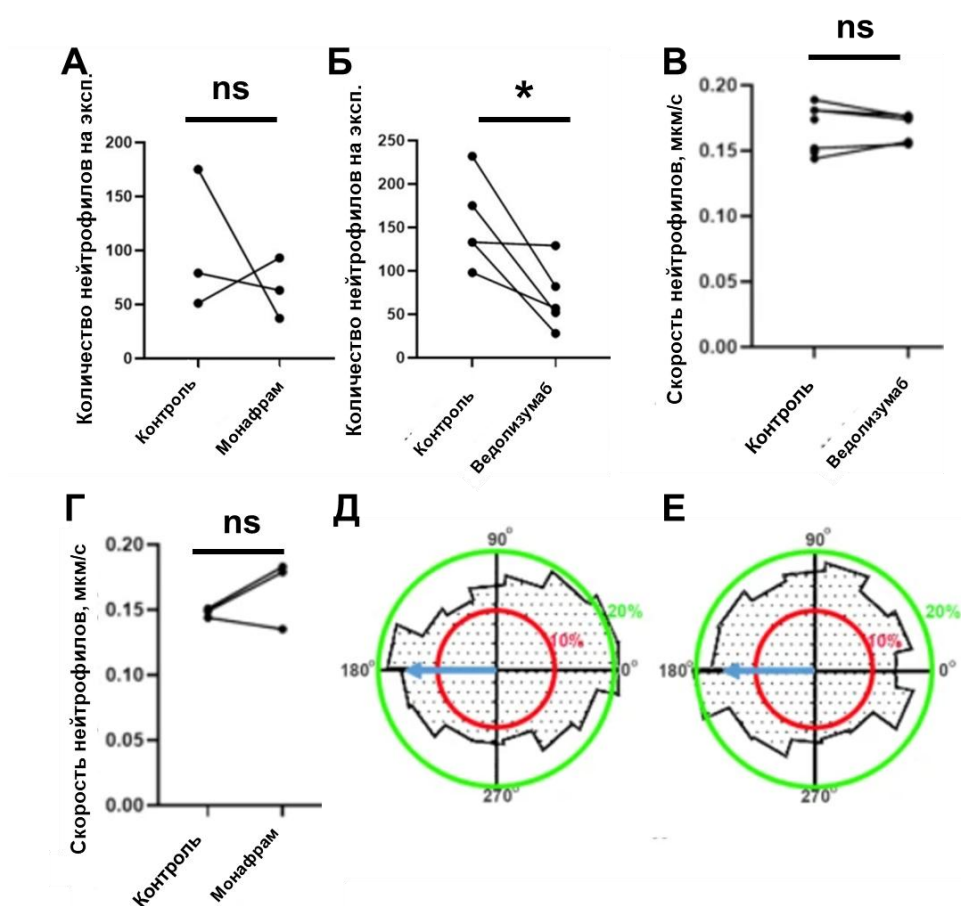


Рисунок 17 – Вклад интегринов в поведение нейтрофилов около тромбов. Влияние антител против интегринов Ведолизумаба (n = 5) и Монафрама (n = 3) на подвижность нейтрофилов при перфузии крови здорового донора со скоростью сдвига 100 c^{-1} через проточную камеру с покровным стеклом, покрытым коллагеном. (А, Б) Средние скорости нейтрофилов. (В,Г) Количество нейтрофилов, адгезировавших к подложке. (Д,Е) Гистограммы направлений движения нейтрофилов. * соответствует $p < 0,05$; ** соответствует $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Статистическая значимость определялась с использованием парного t-критерия.

В образцах, предварительно инкубированных с Ведолизумабом, количество адгезировавших нейтрофилов значительно снизилось (Рисунок 17Б) тогда как

для Монафрама значимых отличий не наблюдалось (Рисунок 17А). Оба ингибитора не оказали влияния на скорость нейтрофилов (Рисунок 17В,Г). Для Ведолизумаба ориентация нейтрофилов против потока сохранялась (Рисунок 17Д). Однако для Монафрама направленность противотока нейтрофилов была утрачена (Рисунок 17Е), что указывает на нарушенный хемотаксис, вероятно, из-за уменьшения размера тромбов, аналогично результатам, полученным для фибриногена или фибронектина. Также в отсутствие ионов кальция, адгезия нейтрофилов к подложке полностью отсутствовала, а рост тромбов был снижен.

3.1.6. Математическое моделирование хемотаксиса нейтрофилов

При анализе экспериментальных траекторий нейтрофилов было обнаружено, что время, в течение которого нейтрофилы здоровых доноров двигались в направлении потока, было короче по сравнению с движением во всех других направлениях (Рисунок 12).

Чтобы объяснить этот результат, мы теоретически рассчитали распределение модельного хемоаттрактанта (ХА), выделяемого активированными тромбоцитами, вокруг экспериментально наблюдаемых тромбов (Рисунок 18). Для этого мы взяли распределение тромбов для 3 случайных полей зрения для 6 здоровых доноров.

Математическая модель, описывающая распространение хемоаттрактанта в потоке, представляет собой систему дифференциальных уравнений в частных производных, интегрированных с использованием метода конечных элементов, реализованную в программном обеспечении COMSOL Multiphysics. Сначала решалось уравнение Навье-Стокса для того, чтобы получить распределение потоков в системе.

Далее с учетом потоков решалось уравнение реакции-диффузии-адвекции для хемоаттрактанта. Мы предположили, что тромбы выделяют хемоаттрактант (ХА) со следующими параметрами: 8 кДа – молекулярная

масса [201], 2900 молекул за время эксперимента (30 минут) – скорость секреции хемоаттрактанта [202], $130 \text{ мкм}^2/\text{с}$ – скорость диффузии [203]). Эти параметры были выбраны на основе параметров основных хемоаттрактантов, выделяемых тромбоцитами – интерлейкинов [204]. Затем мы рассчитали распределение ХА (Рисунок 18). Мы наблюдали, что позади тромбов в потоке образуются «хвосты» ХА. Таким образом, предпочтительное движение нейтрофилов против потока может относиться к движению по градиенту ХА [205]. Модельные расчеты были выполнены для скорости сдвига $\mu = 100 \text{ с}^{-1}$.

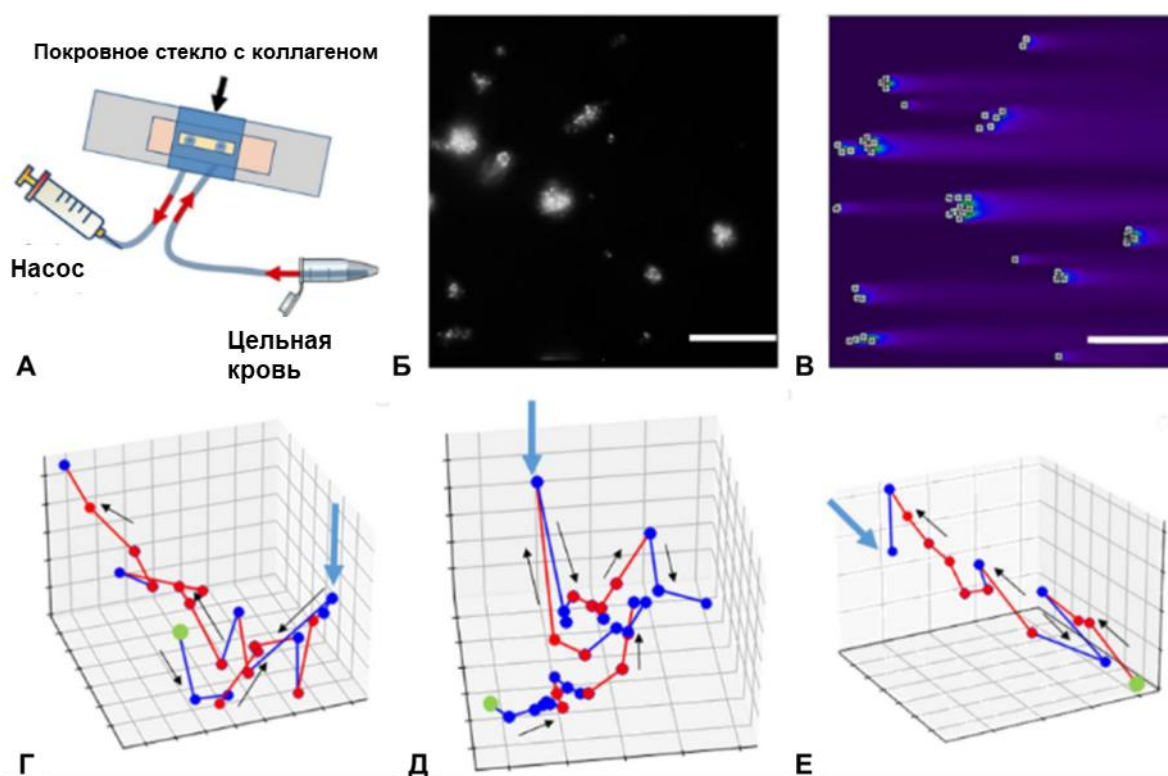


Рисунок 18 – Модель распределения хемокинов вокруг тромбов в проточной камере. А. Исследуемая область в проточной камере. Б. Экспериментальные данные по локализации тромбов. Масштабная линейка 50 мкм. В. Рассчитанное из модели распределение хемоаттрактанта (ХА) вокруг тромбов, изображенных на б. Длинные «хвосты» ХА располагаются за тромбами. Г-Е. Концентрация ХА вдоль типичной траектории нейтрофилов, наблюдаемая в эксперименте. Три типичные клетки. Начало траектории отмечено зеленой точкой. Сегменты траектории, вдоль которых повышается концентрация хемокинов, обозначены красным. Сегменты траектории, вдоль которых понижается концентрация хемокинов, обозначены синим цветом. Некоторые клетки периодически перемещались в зоны с более низкими концентрациями хемокинов (синяя стрелка). Черные стрелки указывают направление траектории

Затем мы рассчитали распределение ХА вдоль известных траекторий нейтрофилов (Рисунок 18). Хотя нейтрофилы часто двигались против градиента ХА в течение 20-40 секунд, иногда они попадали в области с уменьшающейся концентрацией хемокинов, как показано на рисунке 18 (указано синей стрелкой). Следовательно, только анализ траекторий был недостаточен для вывода о том, что движение нейтрофилов вокруг растущего тромба является хемотаксисом.

Чтобы дополнительно исследовать движение нейтрофилов, мы использовали модифицированный алгоритм, разработанный Szatmary et al. [206], который описывает пошаговое принятие решений нейтрофилом, и поместили такой нейтрофил в поле хемоаттрактанта, рассчитанное в предыдущем разделе. В качестве предиктора для смещения клетки мы выбрали долю занятости рецепторов по её длине, как в работе [206]. При этом, в отличие от данной работы, использовался двумерный, а не одномерный DFRO, который имел следующий вид:

$$DFRO = \frac{\ell_c}{K_d} |\nabla c| \frac{1}{(c/K_d + 1)^2}, \quad (10)$$

где $|\nabla c|$ – модуль градиента концентрации хемоаттрактанта.

Расчет градиента хемоаттрактанта проводили с использованием матриц Собеля [207]. Изображение было повернуто так, чтобы направление движения нейтрофилов на предыдущем этапе совпадало с осью x. Размер ядра Собеля по оси абсцисс принимался равным средней длине нейтрофилов ℓ_c в пикселях. Размер ядра Собеля по оси y был принят равным $\ell_c/2$, чтобы учесть эллипсоидную форму лейкоцитов. S_F – константа чувствительности.

Также для движения нейтрофилов учитывалось случайное смещение θ_{random} . Предполагалось, что распределение направлений движения нейтрофилов относительно направления движения хемоаттрактанта подчиняется распределению фон Мизеса-Фишера [206]. Это используется для представления наблюдения о том, что более сильные сигналы градиента (т. Е.

Более высокий DFRO) вызывают большее смещение ориентации клеток в направлении градиента (чем больше κ в распределении фон Мизеса-Фишера, тем больше шанс, что случайно сгенерированный θ_{random} будет малым). Распределение фон Мизеса-Фишера задавалось следующим выражением:

$$f(\theta; \kappa) = \frac{\exp(\kappa \cos(\theta))}{2\pi I_0(\kappa)}, \quad (11)$$

где $I_0(\cdot)$ - модифицированная функция Бесселя порядка 0. На основании этих величин рассчитаем компоненты модельной скорости нейтрофилов на шаге N по рекуррентной формуле:

$$\begin{aligned} v_x^N &= \frac{1}{1+B_{\text{mem}}} v_{\text{avg}} \cos \theta_{\text{sum}}^N + \frac{B_{\text{mem}}}{1+B_{\text{mem}}} v_{\text{avg}} \cos \theta_{\text{sum}}^{N-1}, \\ v_y^N &= \frac{1}{1+B_{\text{mem}}} v_{\text{avg}} \sin \theta_{\text{sum}}^N + \frac{B_{\text{mem}}}{1+B_{\text{mem}}} v_{\text{avg}} \sin \theta_{\text{sum}}^{N-1}, \end{aligned} \quad (12)$$

где $\theta_{\text{sum}} = \theta_{\text{grad}} + \theta_{\text{random}}$, θ_{grad} — направление градиента, $B_{\text{mem}} = L/(\Delta t)$ — коэффициент памяти нейтрофилов, v_{avg} — средняя скорость нейтрофилов, L — время персистентности нейтрофилов [206] и Δt — шаг модели по времени. Мы выбрали v_{avg} , соответствующий экспериментальной средней скорости каждого нейтрофила. Такие параметры, как ℓ_c и L , выбирались для каждого лейкоцита независимо, чтобы как можно лучше соответствовать экспериментальной траектории. Время персистентности L была выбрано в том же порядке величины, как и в Vicker et al. [208] ($L = 22\text{c}$). Размер нейтрофилов ℓ_c выбирали из диапазона 10–20 мкм [209]. Описанный алгоритм реализован на Python 3.6.

Сначала для каждого донора выбирались 3 нейтрофила, затем рассчитывалось поле ХА для квадратного поля зрения со стороной от 100 до 250 мкм вокруг каждого нейтрофила. Некоторые поля содержали более одного нейтрофила. Всего было рассчитано 18 полей для 6 здоровых доноров, не менее одного для каждого здорового донора. Для каждого нейтрофила мы провели 36 запусков модели (Рисунок 28, 16 из 36 траекторий показаны для иллюстрации). Выбранные нейтрофилы соответствовали следующим критериям: а) отсутствие роллинга, б) отсутствие нейтрофилов вверх по

потоку ближе чем на 10 мкм (из-за секреции LTB4 активными нейтрофилами), в) край поля зрения дальше от траектории, чем 10 мкм (так как за краем поля зрения могут находиться тромбы). Из 648 траекторий 433 были похожи на экспериментальные. Но процент успешных проходов сильно различался между клетками. Для 5 траекторий из 18 ни одна модель не могла их описать; с другой стороны, для других 13 более 60% запусков описали их хорошо, а для 8 клеток все случайные запуски модели были успешными. Для модели с нечувствительными к ХА нейтрофилами среднее расстояние по точкам между траекторией модели и экспериментальной траекторией было значимо больше, чем для вышеописанной модели (Рисунок 19).

Таким образом, анализ экспериментального движения нейтрофилов показал, что оно происходит преимущественно в направлении тромбов у здоровых людей, но не у больных с синдромом Швахмана-Даймонда.

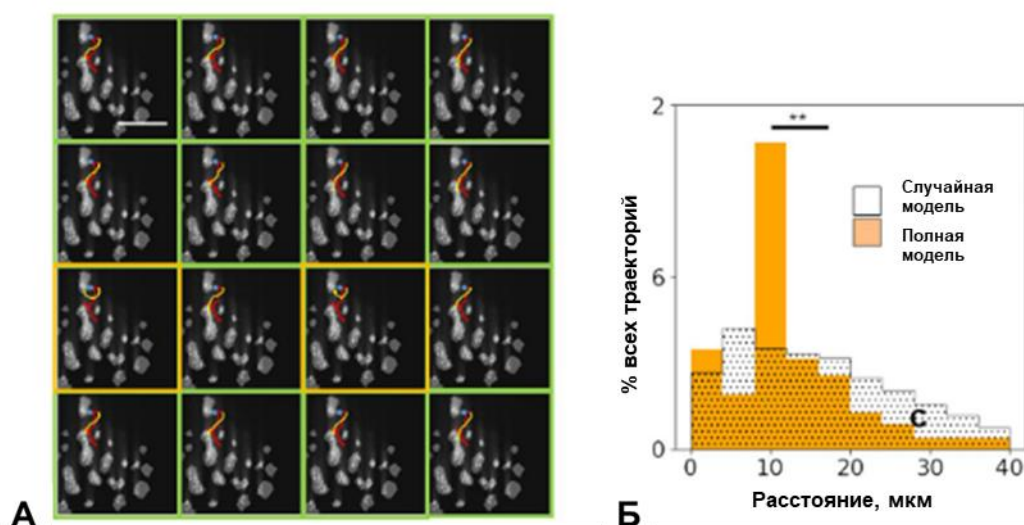


Рисунок 19 – Математическая модель хемотаксиса нейтрофила. А. 16 запусков модели для одной модели нейтрофилов. Модельные траектории, успешно описывающие экспериментальную траекторию нейтрофилов, обозначены зелеными рамками. Неудачные запуски модели отмечены оранжевыми рамками. Масштаб равен 40 мкм. Б. Распределение поточечных расстояний от экспериментальных траекторий до модельных. Оранжевая гистограмма обозначает полные расстояния модели (N = 18 клеток, по 36 траекторий для каждой клетки). Черно-белая гистограмма обозначает случайные расстояния модели (N = 18 клеток, 36 траекторий для каждой клетки). В полной модели среднее расстояние составило 12 мкм по сравнению с 16 мкм в случайной. Для сравнения использовался непараметрический критерий Манна-Уитни. $**p < 0,01$

Это согласуется с данными о нарушении хемотаксиса нейтрофилов у больных с синдромом Швахмана-Даймонда [15].

Было также замечено, что нейтрофилы здоровых доноров предпочитают ориентироваться против потока, что согласуется с общим видом хемокинового градиента, полученным в этой работе. Уменьшающаяся при удалении от тромба концентрация хемокинового «хвоста» побуждает нейтрофил двигаться в направлении, противоположном потоку [210].

Используя математическую модель распределения хемоаттрактантов среди растущих тромбов и объединив ее с моделью движения нейтрофилов в этом поле, нам удалось продемонстрировать, что наблюдаемое движение нейтрофилов действительно является хемотаксисом. Однако модель не смогла описать 28% клеток, что указывает на необходимость принятия во внимание других факторов.

Однако даже на текущем этапе можно сказать, что данная экспериментальная модель позволяет наблюдать хемотаксис нейтрофилов вблизи растущего тромба в цельной крови.

3.2. Хемотаксис и кальциевая сигнализация

3.2.3. Наблюдение кальциевой сигнализации в нейтрофилах

Для изучения кальциевой регуляции хемотаксиса в нейтрофилах человека была модифицирована описанная выше постановка наблюдения хемотаксиса вокруг растущего тромба. Вместо использования AnnV-Alexa-647, Hoechst 33342 и DiOC6, для измерения концентрации кальция использовалась только флуоресцентная метка Fura-Red. Наблюдение хемотаксиса нейтрофилов, кальциевой сигнализации при хемотаксисе роста ламеллиподий производилось на микроскопе Nikon Ti2 AX в режиме конфокальной съемки.

Измерение скорости движения нейтрофилов и роста ламеллиподий производилось с помощью плагина Manual Tracking программного пакета

ImageJ. Измерения проводились только для движущихся нейтрофилов. Линейную скорость роста ламеллиподии измеряли по координатам края движущейся клетки (Рисунок 20А). При этом для измерения скорости роста ламеллиподии брались только первые 30 секунд для исключения влияния перемещения центра тяжести клетки на положение ламеллиподии.

Для исключения влияния выхода клетки из фокальной плоскости объектива на результат измерений, вместо флуоресценции Fura-Red для оценки концентрации кальция использовалось отношение флуоресценции связанной с кальцием краски к флуоресценции свободной Fura Red, F_{405}/F_{488} .

Динамический кальциевый ответ в виде кальциевых осцилляций и одиночных кальциевых пиков наблюдался только в части клеток. При этом скорость движения для клеток, демонстрирующие динамический ответ, была значимо медленнее, чем для клеток, в которых концентрация кальция была постоянной (рис 20). Наличие двух субпопуляций скоростей нейтрофилов согласуется с данными из [57], где было показано, что хемотаксис нейтрофилов можно разделить на два этапа – медленное движение и поисковое поведение и быстрое движение после определении направления движения.

При одновременном измерении скоростей нейтрофилов и концентрации кальция в клетках было показано, что абсолютные концентрации кальция в нейтрофиле не коррелируют со скоростью переднего края клетки для 8 из 9 проанализированных клеток с кальциевым сигналом (корреляции были проанализированы с помощью критерия Пирсона, $p > 0,05$). Типичный вид зависимости показан на рисунке 20В.

При этом, для нейтрофилов, в которых наблюдалось выставление нескольких ламеллиподий и ретракция некоторых из них, пики концентрации кальция в нейтрофилах совпадали с моментом ретракции ламеллиподии, либо отличались не более, чем на один кадр видео, что, скорее всего, связано с недостаточной частотой съемки.

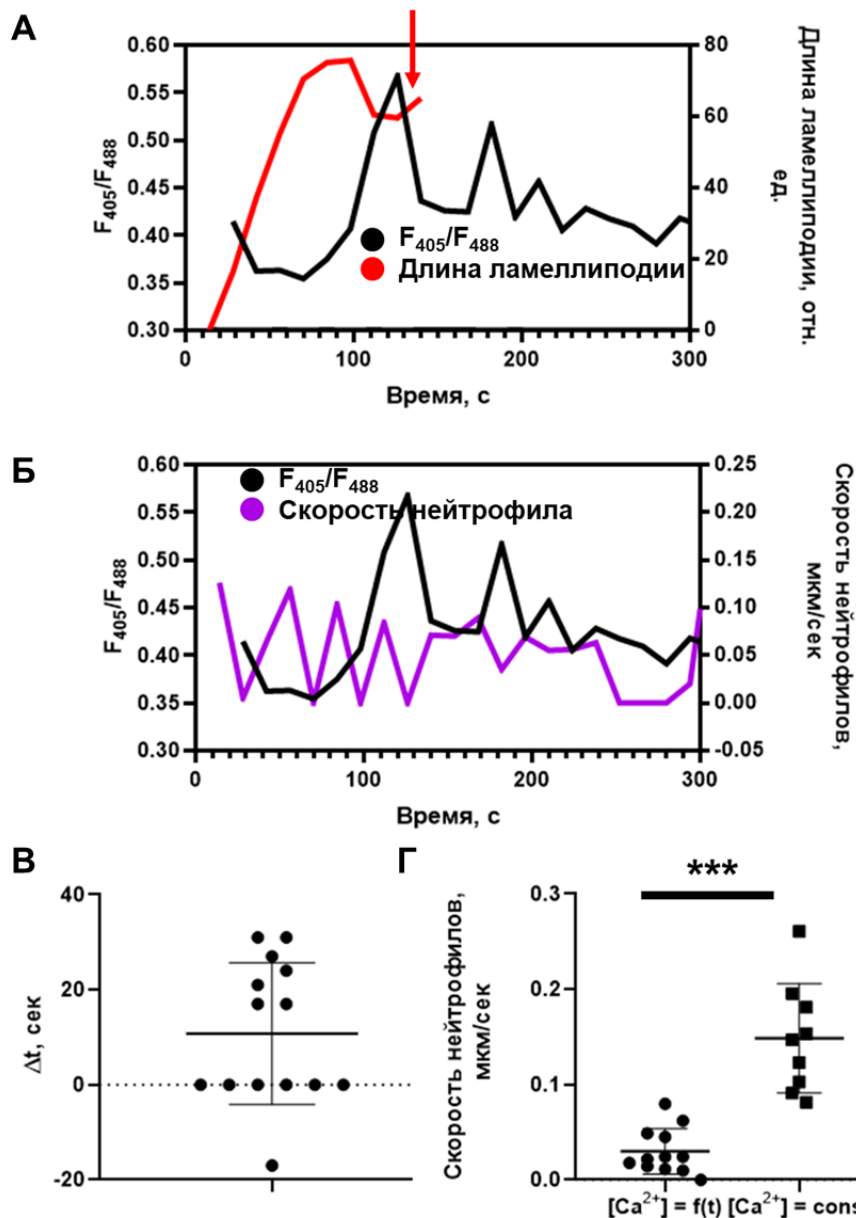


Рисунок 20 – Влияние кальциевого ответа в нейтрофилах на их подвижность. А. Типичный кальциевый ответ в движущемся нейтрофиле. Ретракция ламеллиподий (красная стрелка) совпадает по времени с пиком концентрации кальция. На графике представлен типичный ответ из $N = 14$ событий ретракции ламеллиподий из 9 проанализированных клеток для 3 здоровых доноров. Б. В типичном нейтрофиле кальциевый ответ не коррелирует с подвижностью нейтрофила. На графике представлен типичный ответ из $N = 9$ проанализированных клеток для 3 здоровых доноров. В. Временная задержка между ретракцией ламеллиподии и ближайшим по времени кальциевым пиком. С помощью критерия Уилкоксона ($p = 0,03$) показано, что временная задержка не распределена нормально со средним $\Delta t = 0$ сек. Г. Скорости нейтрофилов для клеток, в которых уровень кальция постоянный, значимо выше, чем для клеток, в которых наблюдается кальциевый ответ. Проанализировано $N = 21$ клеток для 3 здоровых доноров. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$. Статистическая значимость рассчитана с помощью теста Манна-Уитни

С помощью критерия Уилкоксона мы проанализировали разницу между моментом ретракции ламеллиподии и ближайшим пиком концентрации кальция. В случае, если бы данные события являлись независимыми, наблюдалось бы нормальное распределение временных задержек со средней величиной задержки 0 секунд. В реальных экспериментальных данных Δt почти всегда была положительной величиной, и нулевая гипотеза отвергалась ($p=0,03$), что указывает на то, что пик концентрации кальция и ретракция ламеллиподий связаны (Рисунок 20B).

При этом отсутствие связи скорости переднего края клетки с концентрацией кальция противоречит имеющимся экспериментальным данным о влиянии комплекса кальций-кальмодулин на ремоделирование актинового цитоскелета в иммунных клетках путём взаимодействия комплекса кальций-кальмодулин с белком WASP и ускорением ветвления актиновых филаментов путем активации Arp2/3 (Wiscott-Aldrich Syndrome Protein) [211].

3.2.4. Влияние скорости ветвления актина на рост ламеллиподии в хемотактирующем нейтрофиле

Известно, что количество WASP снижено у пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича (WAS). Иммунные клетки пациентов с WAS демонстрируют более низкие скорости хемотаксиса [16, 17], но влияние мутаций WASP на формирование ламеллиподий пока не ясно.

В данной работе было произведено измерение скорости роста ламеллиподий в нейтрофилах, движущихся около растущего тромба, для пациентов с WAS и здоровых контролей. Неожиданно, разница между скоростями роста ламеллиподии у здорового донора и у пациента с синдромом Вискотта-Олдрича оказалась незначимой (Рисунок 21B).

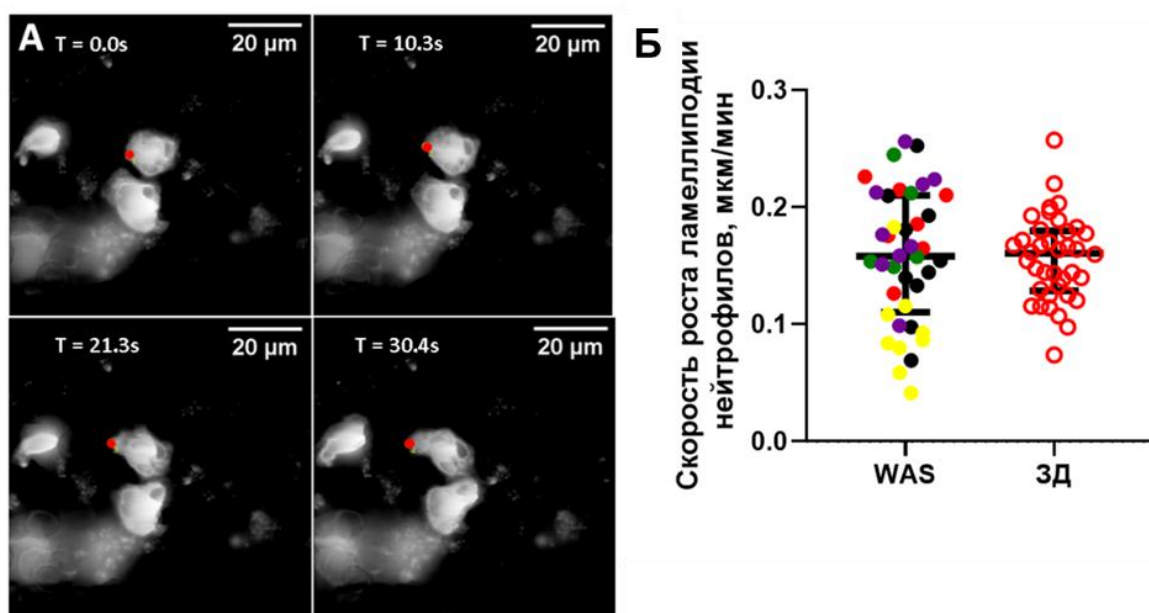


Рисунок 21 – Измерение скорости роста псевдоподий нейтрофилов. А. Типичные изображения растущей псевдоподии. Красная точка обозначает положение края псевдоподии. В. Скорости псевдоподий для здоровых контролей (N = 5) и пациентов с WAS (N = 5)

Для того, чтобы объяснить полученный результат, на основе литературных и полученных в рамках данной работы экспериментальных данных мы построили минимальную стохастическую математическую модель реорганизации актинового цитоскелета при формировании ламеллиподии в хемотактирующем нейтрофиле (Рисунок 22). В этой модели мы описали следующие события: полимеризацию и деполимеризацию F-актина, а также разветвление растущей актиновой сети (Рисунок 22А). Поскольку полимеризация актина регулируется белками WASP, находящимися на плазматической мембране, ветвление актина в модели происходило только в пределах расстояния D от плазматической мембраны (рис 22В). Из-за того, что рост актиновых филаментов регулируется фосфолипидами мембраны, полимеризация актина в модели происходила только в пределах расстояния H от плазматической мембраны (рис 22В). В модели плазматическая мембрана клетки «проталкивалась» растущими концами F-актина. Критическое число толкающих концов ($N_{\text{акт}}$) выбирали по экспериментальным данным.

Вероятность полимеризации, ветвления и деполимеризации актина оценивали по известным скоростям реакции для ферментов человека.

$$P_{on} = 1 - \exp(-k_{on}[G]dt), \quad (13)$$

$$P_{off} = 1 - \exp(-k_{off}dt), \quad (14)$$

$$P_b = k [Arp]dt \quad (15)$$

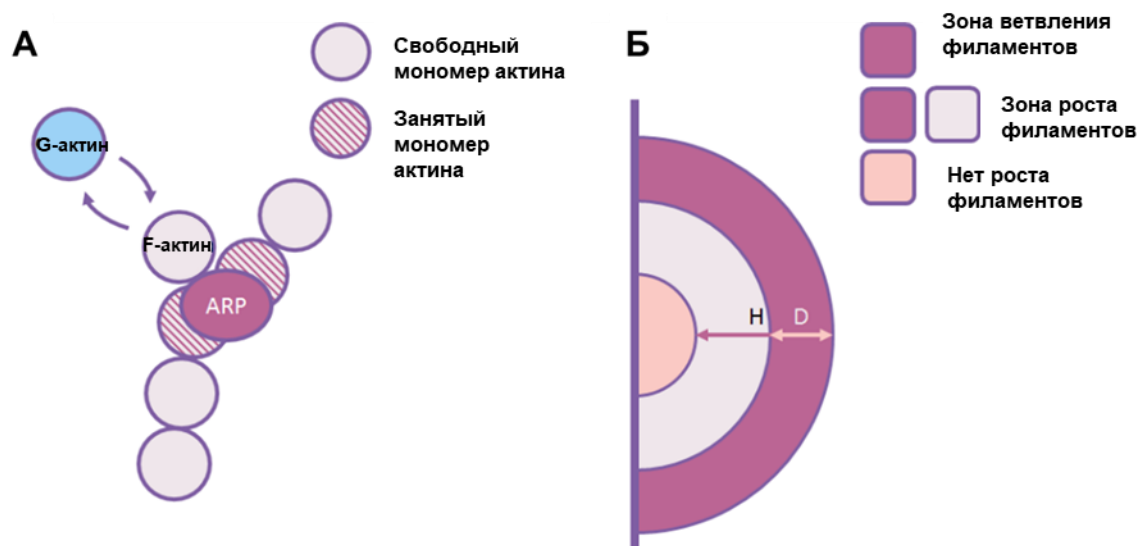


Рисунок 22 – Математическая модель формирования псевдоподии в нейтрофиле. А. Схема роста и ветвления актинового филамента. Б. Зоны роста и ветвления филаментов в модели

Построенная расчетная модель количественно описывала формирование сети актина. Чтобы учесть влияние мутации в WASP, мы понизили модельную скорость ветвления на один порядок и предположили, что если локализация WASP нарушена, ветвление и полимеризация актина могут происходить дальше от мембраны. В модели скорость роста ламеллиподии не показала существенной зависимости ни от скорости ветвления k (Рисунок 23В), ни от расстояния ветвления от мембраны H (Рисунок 23С) в большом интервале значений параметров. При $6 < H < 12$, скорость роста псевдоподии не изменилась более чем на 15 %. При $400 \text{ (M x s)}^{-1} < k < 1000 \text{ (M x s)}^{-1}$, скорость роста псевдоподии не изменилась более чем на 25 %.

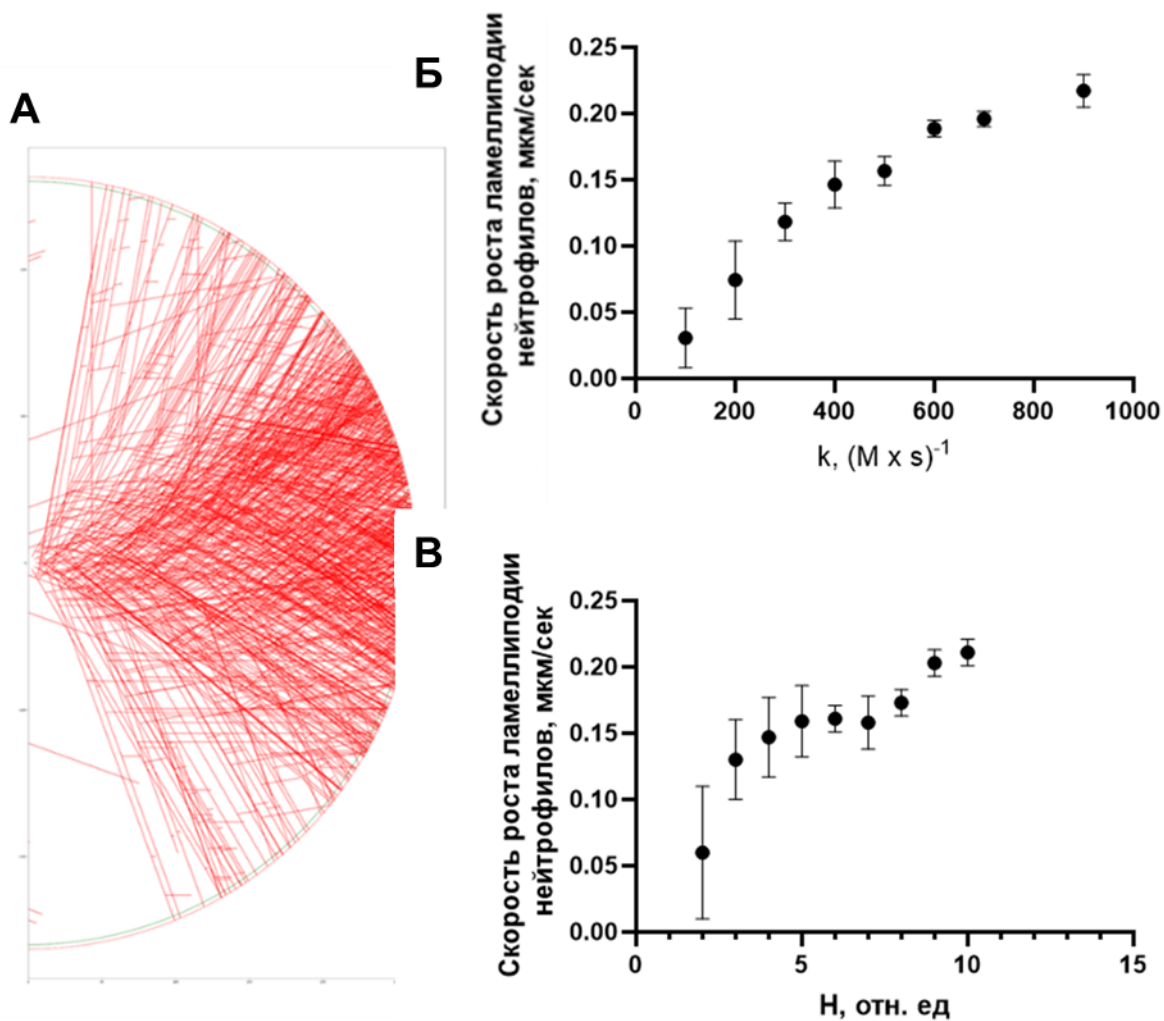


Рисунок 23 – Результаты численного моделирования роста актинового цитоскелета. Для каждого набора параметров было произведено $N = 5$ запусков модели. А. Типичная актиновая сеть, предсказанная моделью. Б. Зависимость скорости выдвигания от скорости ветвления k . В. Зависимость скорости роста протрузии от расстояния ветвления H

3.2.5. Математическая модель кальциевой сигнализации в сперматозоидах человека

Первый модуль модели описывает динамику открытия канала CatSper при добавлении прогестерона. В этой модели рассматривается динамика концентрации белков CatSper, альфа-бета-гидролазы 2 (ABHD2), 2-арахиноилглицерола и арахидоновой кислоты. Каналы CatSper, а также местоположение белка ABHD2 ограничены плазматической мембраной жгутика сперматозоида, а молекулы 2-арахиноилглицерина равномерно распределены по всей плазматической мембране. ABHD2 активируется при

связывании с молекулой прогестерона из внеклеточного пространства. Молекулы 2-AG, которые ингибируют CatSper, расщепляются активированным AVHD2 на глицерин и AA (описывается уравнением Михаэлиса-Ментен). Это приводит к снятию ингибирования CatSper. Также в модели учитывается, что плазматическая мембрана сперматозоидов постоянно продуцирует 2-AG [162]. Уравнения и параметры модели указаны в Приложении П1.

Посредством математического моделирования нами была найдена зависимость вероятности открытия кальциевого канала CatSper от концентрации прогестерона в среде (Рисунок 9). Вероятность открытия канала была рассчитана как отношение количества молекул активированного канала CatSper к общему количеству молекул канала. Данная зависимость согласуется с литературными данными [162].

Также нами была получена зависимость вероятности открытия кальциевого канала CatSper от времени при добавлении 5 μM прогестерона, которая использовалась во втором модуле модели (Рисунок 24Б).

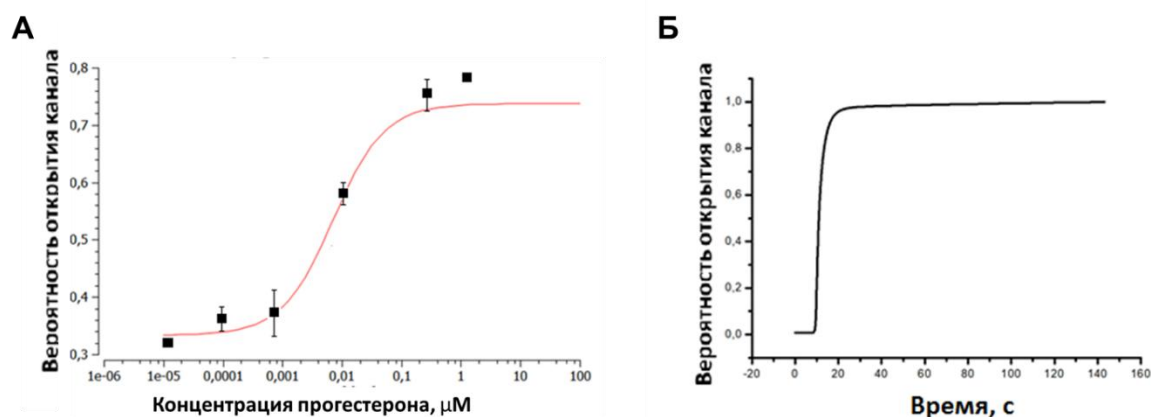


Рисунок 24 – Математическая модель канала CatSper. А. Вероятность открытия кальциевого канала CatSper. Красная линия – данные модели. Черные точки – экспериментальные данные [162]. Б. Зависимость вероятности открытия кальциевого канала CatSper от времени при добавлении 5 μM прогестерона

Вторая часть модели описывает динамику $[\text{Ca}^{2+}]$ и $[\text{IP}_3]$. Ионы кальция попадают в цитозоль через открытые каналы CatSper и затем диффундируют в шейку сперматозоида, где находится специфическая для сперматозоида

изоформа фосфолипазы C, PLC δ 4, активность которой регулируется [Ca²⁺]. Рецепторы к IP₃ расположены на кальциевом депо сперматозоида, RNE. Кальциевая АТФаза PMCA, присутствующая в мембране жгутика спермы, экструдирует кальций во внеклеточную среду. Кальциевая АТФаза сигнального пути (SPCA) переносит кальций из цитозоли в кальциевое депо.

Кальциевые буферы, такие как кальмодулин (CaM), расположенный в цитозоле, и кальретикулин (CalRet), расположенный в эндоплазматическом ретикулуме, способны обратимо связывать кальций. Для каждого мобильного буфера рассматривается вклад двух некооперативных сайтов: сайтов C и P для кальретикулина и C и N для кальмодулина [212].

Геометрия трехмерной модели (Рисунок 25) состоит из внеклеточного пространства (900 fl), цитозоли (22 fl), разделенной на жгутик (диаметром 0,4 мкм, длиной 26 мкм), шейку (диаметром 0,6 мкм, длиной 6 мкм). и головку сперматозоида (20 fl), а также кальциевое депо RNE (0.8 fl), расположенное между головкой и шейкой сперматозоида. Трехмерная модель отличается от однородной модели тем, что она учитывает диффузию ионов кальция и IP₃. Диффузия буферов кальция, кальция и IP₃ описывается законом Фика. Некоторые из реакций ограничены определенными участками сперматозоида (Рисунок 25); например, генерация IP₃ фосфолипазой C происходит в шейке сперматозоида.

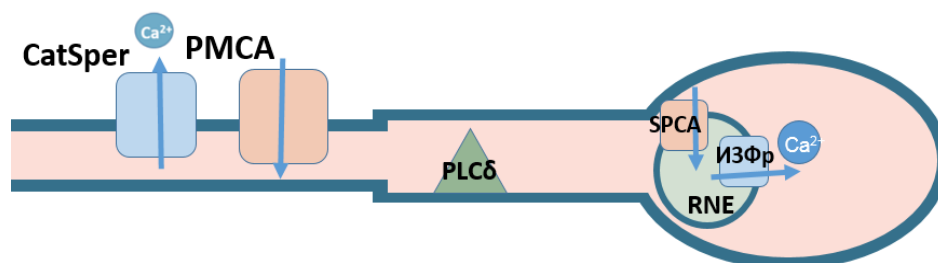


Рисунок 25 – Схема кальциевой сигнализации в сперматозоидах человека. Кальциевый канал CatSper и АТФаза PMCA локализованы в жгуте сперматозоида. Активность PLC δ ограничена шейкой и головкой сперматозоида. Кальциевое депо и локализованные на нем И3Фр и SPCA расположены в головке сперматозоида

3.2.6. Модель кальциевой сигнализации в сперматозоидах мыши

На основе литературных данных нами был предположен следующий механизм активации сперматозоидов мыши прогестероном (Рисунок 26). Прогестерон, свободно проникая через плазматическую мембрану, активирует находящуюся на акросоме AVHD2 (возможен также вклад фосфолипазы A2, но с точки зрения модели это не вносит качественных изменений), что приводит к генерации арахидоновой кислоты и ее трансформации циклооксигеназным путем в PGE2 (или другой простаноид). Хотя у мыши есть активные рецепторы к PGE2, в том числе EP1 [22], данные об их наличии и локализации в сперматозоидах найдены не были. Есть данные, что на акросоме сперматозоидов мыши локализован рецептор к эстрогену (GPER), который относится к тому же классу рецепторов, что и EP1 [23]. В работе мы предполагали, что простаноид (PGE2) активирует GPCR (EP1), находящийся на плазматической мембране в районе акросомы, так как в жгутике сперматозоида мыши нет достаточного количества фосфоинозитидов для работы PLC [24]. Далее с активной α q-субъединицей G-белка ассоциируется PLC β 1 [25], и кальциевая сигнализация индуцируется по пути, описанному выше для сперматозоида человека, с тем отличием, что кальциевым депо является акросома, а не избыточная ядерная мембрана. Также учитывается, что в сперматозоидах мыши кроме PLC β 1 находится PLC δ 4 [26].

Для каждого мобильного буфера рассматривается вклад двух некооперативных сайтов: сайтов C и P для кальретикулина и C и N для кальмодулина [33]. Активацию G-белка мы описываем согласно модели Катанаева и соавт. [34]. Детали построения и валидации моделей для сперматозоида человека даны в работе [15]. Модель была разбита на два модуля. В первом модуле описывается цепочка биохимических реакций от активации AVHD2 прогестероном до активации PLC β . Второй модуль модели описывает динамику внутриклеточного кальция и IP $_3$.

В трехмерной модели учитывается диффузия ионов кальция, IP_3 , CaM и других веществ, и пространственная локализация ферментов и каналов. В точечной модели по сравнению с трехмерной были изменены параметры $k_{PLC} = 180 \text{ с}^{-1}$ для предотвращения самопроизвольной кальциевой активации фосфолипазы (при высоком значении константы стационарное состояние модели соответствовало опустошенному депо); для исследования режимов использовались также другие значения. С точки зрения сопоставления моделей, физический смысл уменьшения константы связан с уменьшением концентраций ряда веществ (начиная с IP_3) в месте их действия по сравнению с местом производства.

Уравнения и параметры модели указаны в Приложении П2.

Предполагаемая схема модели показана на рис. 11. Первый модуль модели состоит из 11 уравнений, описывающих активацию фосфолипазы С прогестероном. В модуле были использованы значения для режима №4 из модели Катанаева [34]. Для оценки адекватности выбора использовались экспериментальные данные [35]. Далее была использована теорема Тихонова [36] для частичной редукции модели (Рисунок 28). Детали даны в Приложении П2.

Второй модуль модели состоит из 8 уравнений, описывающих кальциевую сигнализацию в сперматозоиде мыши в ответ на активацию PLC β . С целью обеспечения независимого исследования модулей на вход модели подавалась активность PLC β на мембране в головке и шейке, аппроксимированная из первого модуля модели. Несмотря на то что мы для полноты картины учли в модели фосфолипазу PLC δ_4 , также способную в принципе давать колебания через наличие положительной обратной связи, период этих колебаний слишком сильно отличается, и такая возможность не является значимой для целей данного исследования. Далее для второго модуля также была использована теорема Тихонова для частичной редукции модели (Рисунок 29). Детали даны в Приложении П2.

Трехмерная модель была создана с использованием программного обеспечения VCell (<http://www.vcell.org/>). Соответствующая модель Virtual Cell, MouseSpermCalcium, представлена в открытом доступе на <http://www.vcell.org/> под именем пользователя Juliajessica. Детали геометрии модели представлены в Таблице П.3 Приложения. Геометрия трехмерной модели включает в себя цитозоль сперматозоида (56 мкм^3), разделенный на жгутик сперматозоида (0.4 мкм в диаметре, 115 мкм длиной [46]), шейку (0.8 мкм в диаметре [47], 20 мкм длиной [48]) и головку сперматозоида ($8 \times 3 \times 2.5 \text{ мкм}$ [48]), акросому сперматозоида, служащую кальциевым депо (1.3 мкм^3) [17], расположенную в головке сперматозоида (Рисунок 27, Таблица П.3), а также клеточную мембрану и мембрану акросомы. Граничные условия второго рода были использованы для всех веществ. Данные о локализации веществ и учете диффузии даны в Таблице П.4 Приложения. Все вещества, находящиеся в акросоме, считались хорошо перемешанными.

Для перевода объемных концентраций и констант диссоциации в поверхностные использовался коэффициент $\omega_q = N_a \frac{V_q}{S_q}$, где N_a – число Авогадро, V_q – объем компартмента q , S_q – площадь поверхности компартмента q . ω_{Acr} и ω_{Cyt} соответствуют акросоме и цитозолю.

Для описания экспериментально наблюдаемых откликов кальция в модуле модели, описывающем кальциевый ответ, варьировалась каталитическая константа фосфолипазы C (k_{PLC}) (Рисунок 28). Обоснование изменения k_{PLC} заключалось в том, что в образце спермы, инкубированном в капацитирующих условиях, присутствуют как минимум две субпопуляции сперматозоидов [37], различающиеся по своему мембранному потенциалу, влияющему на активность потенциал-чувствительной фосфатазы (VSP) [24], регулирующей концентрацию фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфата (PIP_2) в сперматозоидах.

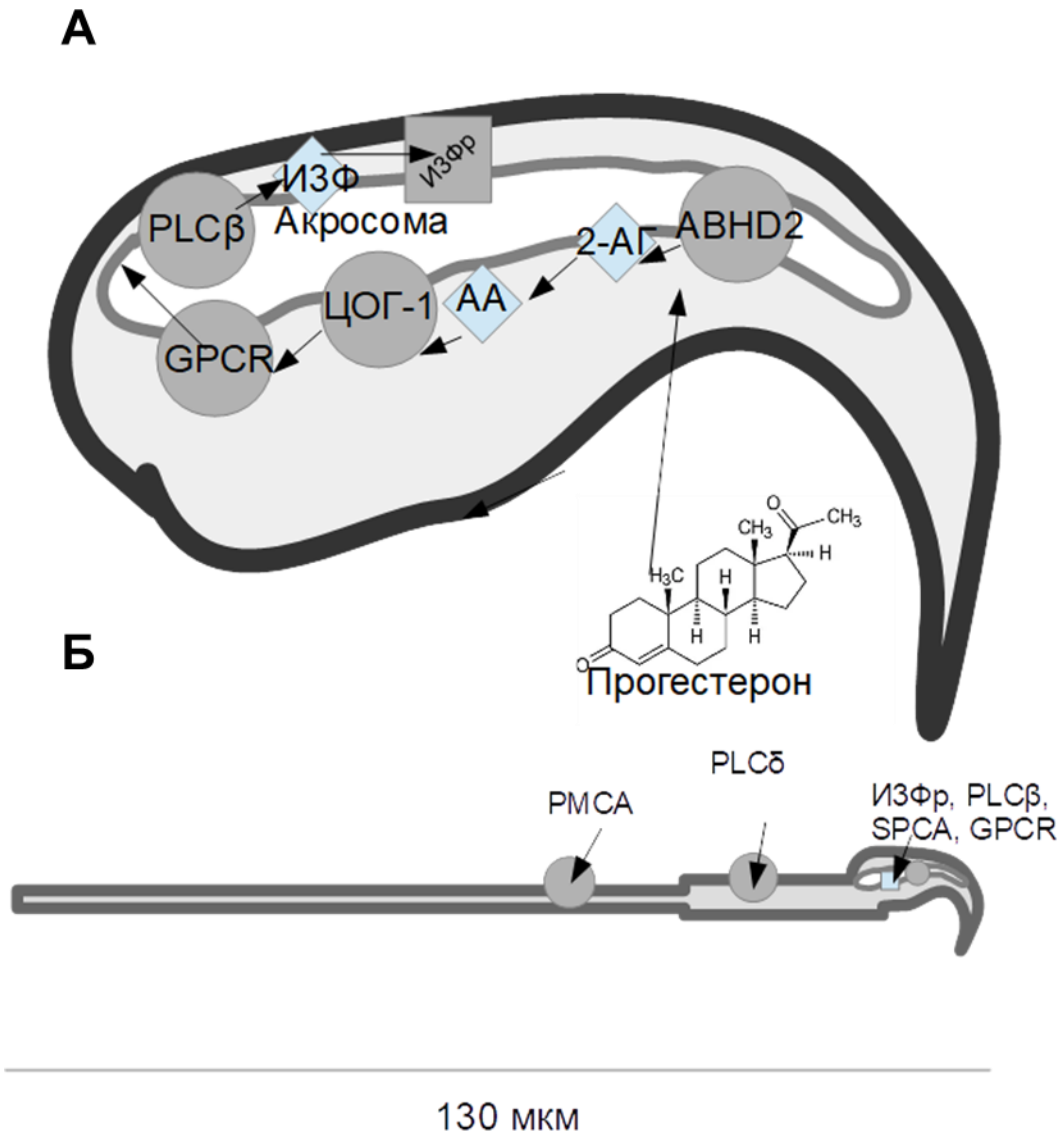


Рисунок 26 – Схема кальциевой активации сперматозоидов мыши прогестероном. А. Общая схема реакций. ABHD2 активируется прогестероном и расщепляет 2-арахидоноилглицерол (2-AG) до арахидоновой кислоты (AA) и глицерина. Арахидоновая кислота трансформируется присутствующей в сперматозоидах мыши циклооксигеназой-1 (COX-1) в некоторый простаноид (возможно, PGE₂), активирующий ассоциированный с G-белком рецептор (GPCR). На рисунке GPCR изображен на плазматической мембране, но в модели он также мог находиться на мембране акросомы. Далее происходит активация фосфолипазы Cβ (PLCβ), катализирующей производство инозитол-1,4,5-трифосфата (IP₃), активирующего каналы-рецепторы к IP₃ (IP₃R), расположенные в мембране внутриклеточного хранилища кальция в сперматозоиде (акросомы). Б – Схема пространственного распределения компонентов системы. В настоящей работе предполагалось, что АТФ-аза плазматической мембраны (PMCA) в сперматозоидах мыши активна в жгутике сперматозоида, производство IP₃ локализовано в шейке и головке сперматозоида, а IP₃R и АТФ-аза секреторного пути (SPCA) локализованы в мембране акросомы

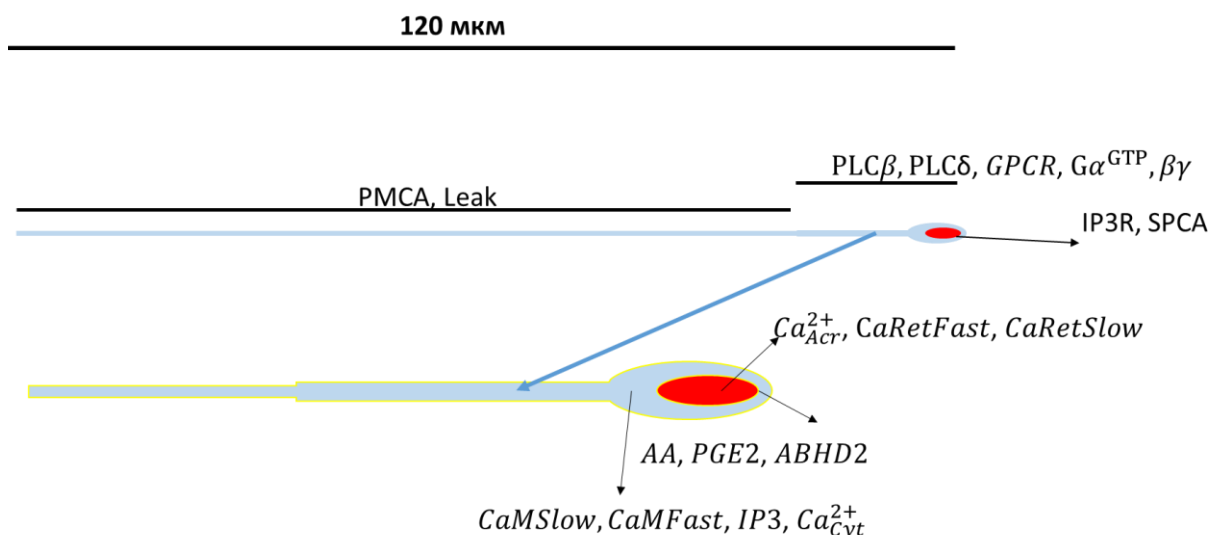


Рисунок 27 – Общий вид геометрии модели. Расположение веществ. Пространственное ограничение некоторых реакций. Синяя область – цитозоль сперматозоида. Красная область – акросома сперматозоида. Желтая область – мембрана сперматозоида

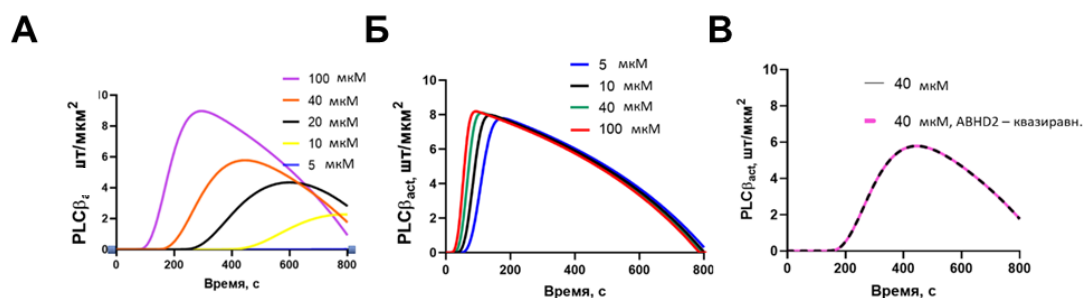


Рисунок 28 – Динамика количества активированной фосфолипазы. А. Режим 4 из [34]. Б. Режим 2 из [34]. В. Сравнение полной модели и модели с примененным квазиравновесным приближением для ABHD2

3.2.7. Кальциевый ответ на активацию прогестероном в сперматозоидах млекопитающих

В ходе экспериментов было показано, что сперматозоиды мыши активируются прогестероном в суспензии в концентрации 50 мкМ с шириной кальциевого пика 120 ± 35 с (средние \pm SD) и высотой 0.8 ± 0.3 мкМ относительно базового уровня кальция, в то время как одиночные сперматозоиды человека – в концентрации 5 мкМ с шириной 160 ± 44 с и высотой 0.5 ± 0.2 мкМ или кальциевыми осцилляциями с периодом порядка сотен секунд (Рисунок 30).

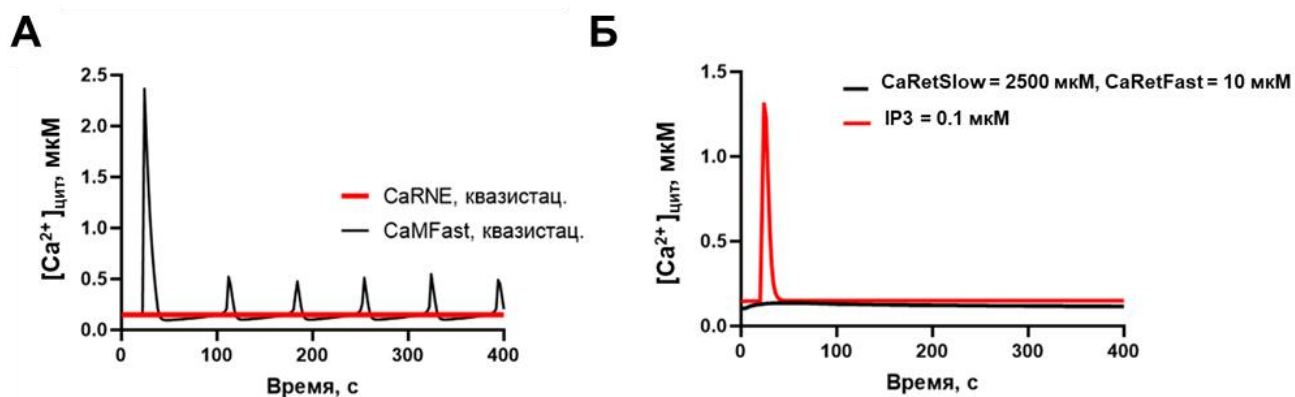


Рисунок 29 – Упрощение второго модуля модели. А. При использовании квазистационарного (квазистац.) приближения для концентрации быстрого сайта кальмодулина, кальциевый ответ не меняется (черная кривая). Для кальция в депо при использовании квазистационарного приближения кальциевый ответ отсутствует. Б. При использовании квазиравновесного приближения для кальретикулина, кальциевый ответ отсутствует. При использовании квазистационарного приближения для IP_3 кальциевый ответ сохраняется, но осцилляции в модели отсутствуют при любых значениях концентрации IP_3

Характерная ширина определяется как ширина пика на высоте пика 10% от максимальной амплитуды. В силу усреднения ответа по всем клеткам при измерении уровня кальция в суспензии, в наших экспериментах не наблюдался осцилляторный ответ в сперматозоидах мыши, при этом в литературе присутствуют данные об осцилляторных ответах в ответ на прогестерон [35].

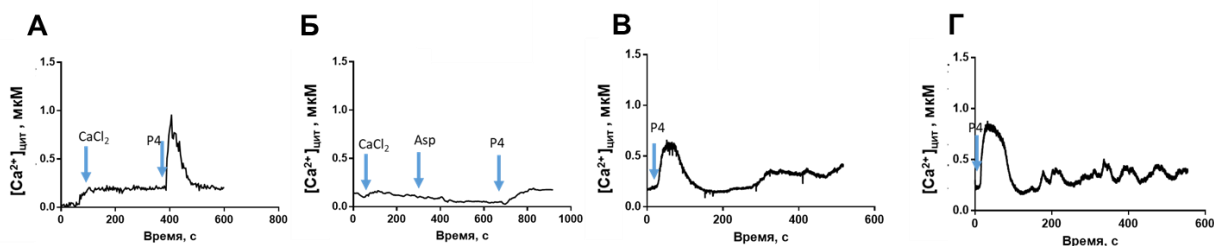


Рисунок 30 – Кальциевый ответ на активацию прогестероном в сперматозоидах. А. Типичный кальциевый ответ суспензии сперматозоидов мыши в ответ на активацию 50 мкМ прогестероном с характерным временем активации и ответа 120 ± 35 с (среднее \pm SD). Стрелкой указаны времена добавления $CaCl_2$, прогестерона (P4). Общее количество экспериментов для P4: $N = 3$. Б. Типичный ответ на прогестерон при преинкубации с 100 нг/мл аспирина. Стрелкой указаны времена добавления $CaCl_2$, прогестерона (P4) и аспирина (Asp). Общее количество экспериментов для P4 + Asp: $N = 3$. В, Г. Типичные кальциевые ответы, наблюдаемые в одиночных сперматозоидах человека в ответ на активацию 5 мкМ прогестероном, стрелкой указано время добавления прогестерона (P4). В. Типичный одиночный пик с характерным временем 160 ± 44 с. Воспроизведено из работы [15]. Ответило $N_{клеток} = 36$ из 64. Г. Типичный вид кальциевых осцилляций. Воспроизведено из работы [15]. Ответило $N_{клеток} = 18$ из 64

Также произведены эксперименты с добавлением аспирина к сперматозоидам мыши. Показано, что кальциевый ответ на прогестерон отсутствует в сперматозоидах мыши при пятиминутной преинкубации с 100 нг/мл аспирина (Рисунок 30Б). Это подтверждает предложенную схему активации сперматозоида мыши прогестероном.

3.2.8. Трехмерная модель позволяет провести количественное описание экспериментальных данных по кальциевому ответу в сперматозоидах

Для описания полученных экспериментальных результатов по индуцированной прогестероном кальциевой сигнализации в сперматозоидах мыши и человека, мы использовали сначала точечную, а потом трехмерную модели (см. Материалы и методы).

Точечная модель прогестерон-индуцированной кальциевой сигнализации в сперматозоидах человека была способна качественно описать как осцилляторный ответ (Рисунок 31Д), так и одиночный пик (Рисунок 31Б). Однако в случае сперматозоидов человека, максимальная ширина пика, описываемая одномерной моделью, составляет 40 с, а максимальный период осцилляций – 50 с (максимумы, полученные в серии запусков с варьированием параметров при условии высоты пика не более 1,5 мкМ).

В случае сперматозоидов мыши в точечной модели существует режим одиночного пика (Рисунок 31З), а также кальциевые осцилляции с периодом порядка сотен секунд, наблюдаемые в других работах [35]. Как и в случае сперматозоидов человека, в случае сперматозоидов мыши максимальная ширина пика, описываемая одномерной моделью, составляет 40 с (Рисунок 31З), максимальный период осцилляций – 70 с (Рисунок 31К), что значительно меньше экспериментально наблюдаемых периода осцилляций и ширины пика.

Трехмерная модель и для сперматозоидов человека, и для сперматозоидов мыши была способна количественно описать ширину пика в

~100 с (Рисунок 31В) и частоту осцилляций (100–300 с) (Рисунок 31Е) при коэффициенте диффузии кальция меньшем, чем $20 \text{ мкм}^2/\text{с}$.

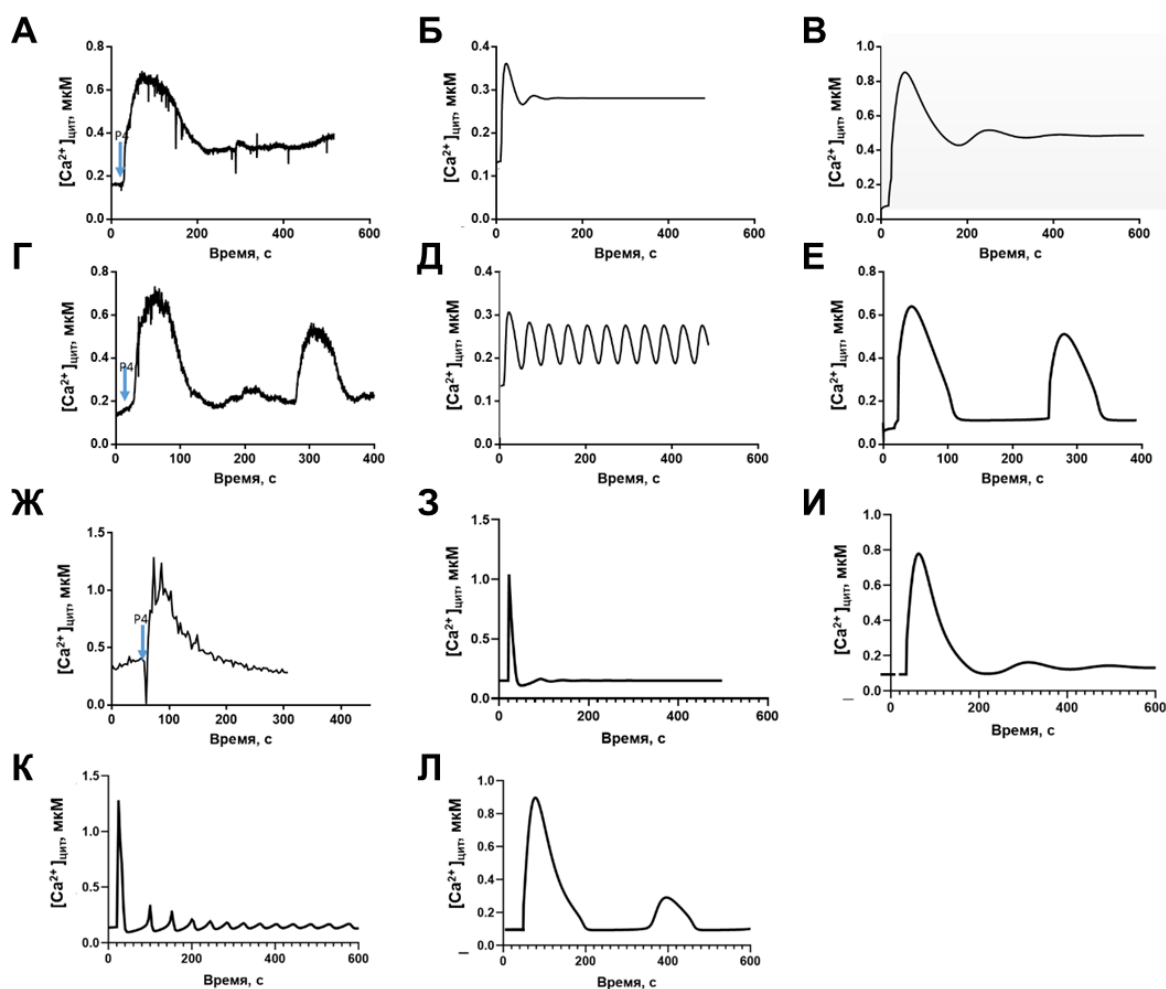


Рисунок 31 – Сравнение результатов моделирования с экспериментальными. А. Типичный экспериментально наблюдаемый одиночный пик в сперматозоидах человека в ответ на активацию 5 мкМ прогестерона имеет ширину ~150 с [15]. Б. В гомогенной модели одиночный пик имеет ширину ~50 с. В. В гетерогенной модели одиночный пик имеет ширину ~150 с. Г. Типичный вид низкочастотных кальциевых осцилляций, наблюдаемых в сперматозоиде человека периодом ~200 с [10]. Д. В гомогенной модели осцилляции имеют порядок периода ~50 с. Е. Осцилляции в гетерогенной модели. Ж. Типичный кальциевый ответ на активацию 50 мкМ прогестероном в сперматозоидах мыши, ширина пика ~100 с. З. В гомогенной модели мыши одиночный пик имеет максимальную ширину 40 с. И. В гетерогенной модели мыши одиночный пик имеет ширину 150 с. К. Осцилляции кальция в гомогенной модели мыши. Л. Осцилляции кальция в гетерогенной модели мыши

3.2.9. Роль пространственной конфигурации системы

При помощи трехмерной модели кальциевой сигнализации в сперматозоидах мыши нами было проведено теоретическое исследование

характера зависимости кальциевого ответа от коэффициента диффузии кальция. Было показано, что система может переключать свой тип ответа с осцилляторного на одиночный пик при изменении коэффициента диффузии кальция (Рисунок 32А). В сперматозоидах мыши при фиксированном коэффициенте диффузии D_{Ca} , равном $10 \text{ мкм}^2/\text{с}$, колебания в системе появлялись при коэффициенте диффузии кальция менее $143 \text{ мкм}^2/\text{с}$ (Рисунок 32А). Для сперматозоидов человека показано, что в сперматозоидах человека при фиксированном коэффициенте диффузии D_{Ca} , равном $10 \text{ мкм}^2/\text{с}$, колебания в системе появлялись при коэффициенте диффузии кальция менее $70 \text{ мкм}^2/\text{с}$ [15] (Рисунок 32А). Наблюдалось, что период осцилляций увеличивался при увеличении коэффициента диффузии кальция как в сперматозоидах мыши (Рисунок 32А, красная линия), так и в сперматозоидах человека.

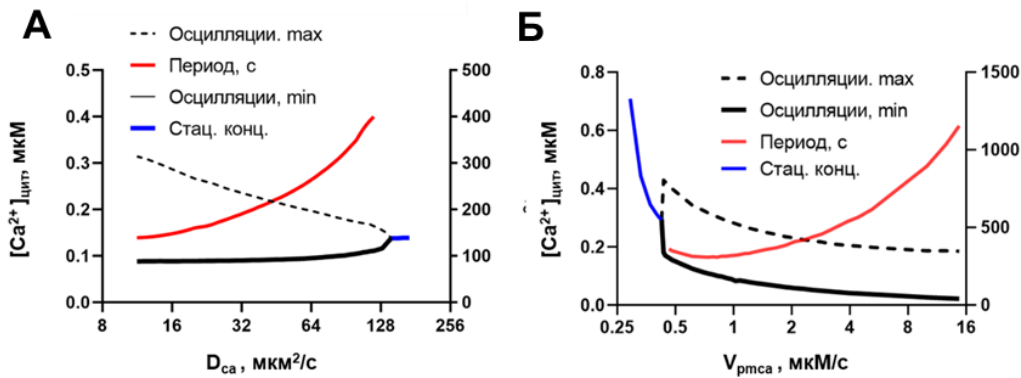


Рисунок 32 – Теоретическое исследование трехмерной модели. Сперматозоид мыши.
 А. Вариация коэффициента диффузии кальция D_{Ca} приводит к исчезновению кальциевых осцилляций для более высоких D_{Ca} . Б. Наличие осцилляций, их амплитуда и период зависят от V_{PMCA} – максимальной скорости работы РМСА. Сплошная черная линия – минимум амплитуды осцилляций. Сплошная синяя линия – стационарное значение концентрации кальция (Стац. конц.), режим пика. Штриховая линия – максимум амплитуды кальциевых осцилляций. Красная линия – период кальциевых осцилляций (ось справа)

Также мы исследовали влияние пространственного распределения компонентов системы на тип ответа. Мы показали, что наличие осцилляций возможно только при скорости экструзии кальция кальциевой помпой РМСА большей, чем $0.43 \text{ мкМ}/\text{с}$ (Рисунок 32Б) для сперматозоидов мыши и большей, чем $0.68 \text{ мкМ}/\text{с}$ и меньшей, чем $3.9 \text{ мкМ}/\text{с}$ для сперматозоидов человека (Рисунок 33). Также период осцилляций зависел от V_{PMCA} почти линейно и для

сперматозоидов мыши (Рисунок 32Б), и для сперматозоидов человека (Рисунок 33) (на рисунке шкала нелинейна).

В полной модели для сперматозоидов человека и мыши предполагалось, что РМСА в сперматозоидах локализована в жгутике. Несмотря на то что ее присутствие в акросоме нельзя исключить, качественно это не меняет ситуацию в модели в силу того, что она в любом случае дублирует там SPCA, параметры которой подбираются; можно считать, что SPCA в модели кальциевой сигнализации и для человека, и для мыши отражает суммарную активность SPCA и РМСА в акросоме.

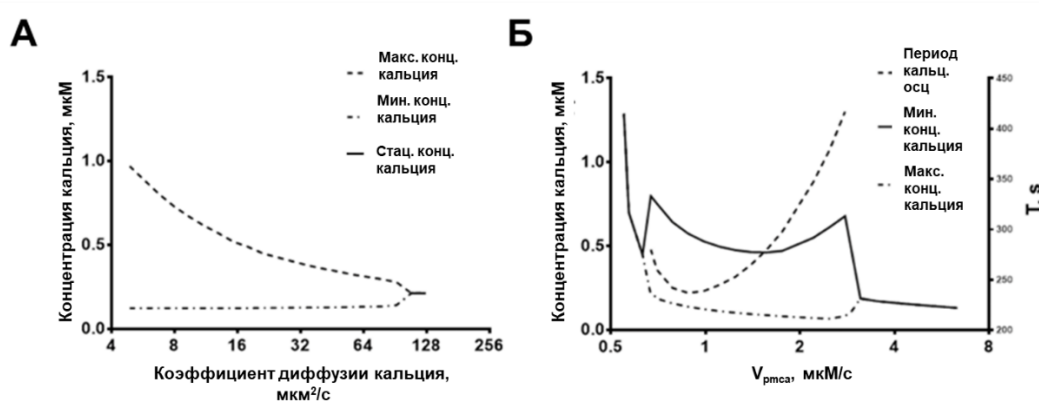


Рисунок 33 – Исследование трехмерной модели. Сперматозоид человека. А. Изменение коэффициента диффузии ионов кальция в трехмерной модели сперматозоидов человека приводит к исчезновению колебаний при более высоких значениях D_{Ca} . Сплошная линия представляет собой стационарную концентрацию кальция. Пунктирная линия обозначает максимум колебаний кальция. Пунктирная линия с точкой обозначает минимум концентрации кальция при колебаниях кальция. Б. Изменение V_{max} для РМСА. Сплошная черная линия обозначает установившуюся или минимальную концентрацию кальция. Черная пунктирная линия с точкой обозначает область колебаний кальция и максимальную концентрацию кальция во время колебаний. Черная пунктирная линия обозначает период колебаний

При этом в модели для мыши, где РМСА была равномерно распределена, кальциевые колебания исчезли, а ширина одиночного пика уменьшилась до 30 с, а в модели для человека их период упал до 90 секунд.

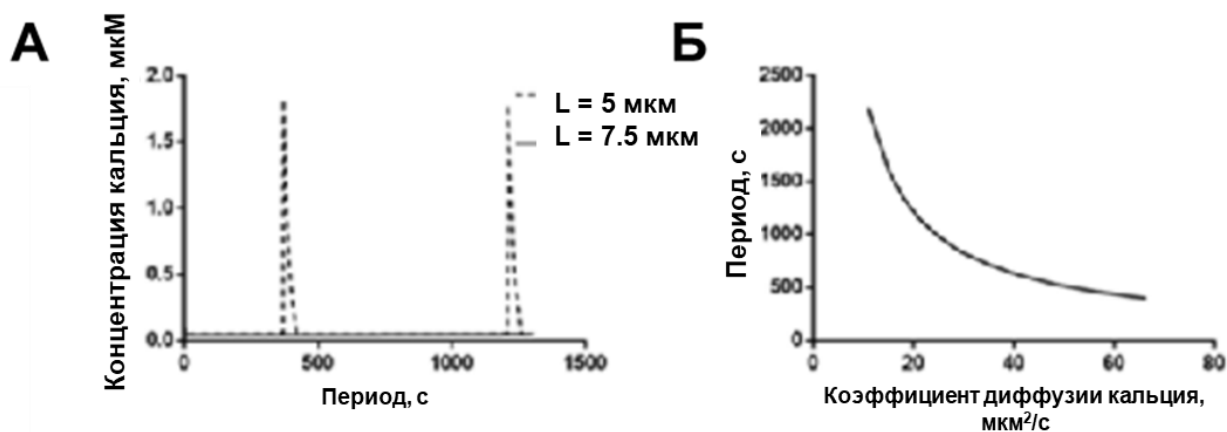


Рисунок 34 – Спонтанные колебания кальция. Трехмерная модель. А. Наличие кальциевых осцилляций в сперматозоиде человека было продемонстрировано при расстоянии L от RNE до жгутика в 5 мкм (черная линия), но не 7,5 мкм (пунктирная линия). Б. Зависимость частоты спонтанных кальциевых осцилляций в сперматозоиде человека от коэффициента диффузии кальция D_{Ca}

Также для сперматозоидов человека в модели наблюдались спонтанные кальциевые осцилляции, совпадающие по периоду (~ 500 с) с экспериментально наблюдаемыми. Их период (T_{sp}) также зависел от коэффициента диффузии кальция (Рисунок 34Б). Интересно, что когда в математической модели расстояние (L) между жгутиком и RNE сперматозоида было больше 7,5 мкм, колебания исчезали (Рисунок 34А, сплошная линия).

3.2.10. Связь кальциевой сигнализации и подвижности сперматозоидов

Таким образом, мы показали, что частота прогестерон-индуцированных осцилляций в математической модели кальциевого ответа в сперматозоиде человека зависит от степени активации кальциевого канала CatSper. Максимальная активность CatSper ($V_{catsper}$) увеличивается при увеличении концентрации прогестерона. Для симуляции разной степени активации сперматозоидов прогестероном, $V_{catsper}$ была проварьирована в диапазоне от 0 до 1,5 мкМ, и для различных значений была получен период осцилляций концентрации кальция.

Показано, что кальциевые осцилляции существуют для $0 < V_{catsper} < 1,05$ мкМ (Рисунок 35А). При этом, чем выше было $V_{catsper}$ (что соответствовало более сильной активации прогестероном), тем меньше был период кальциевых

осцилляций (Рисунок 35). Также производная концентрации кальция, усредненная в окне 0,2 секунды, оказалась значимо отлична от нуля только в промежутки времени, соответствующие пикам концентрации кальция при осцилляциях (Рисунок 35В), что в дальнейшем позволяло говорить об эквивалентности влияния производной концентрации кальция и периода кальциевых осцилляций.

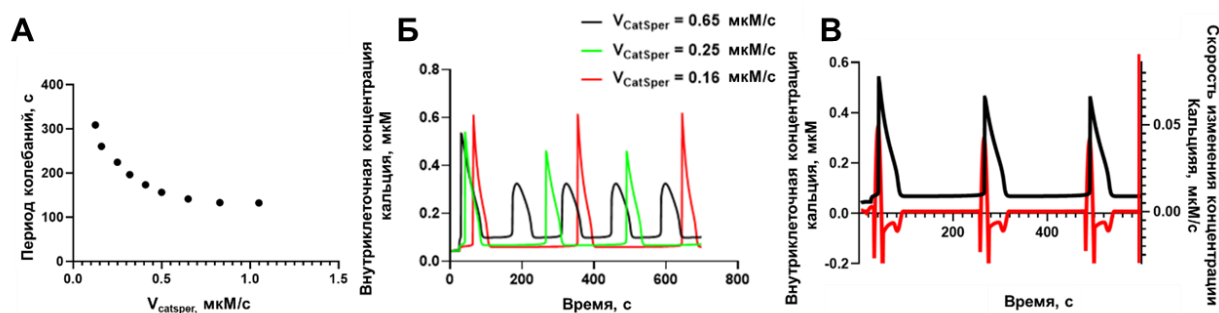


Рисунок 35 – Зависимость периода кальциевых осцилляций от $V_{catsper}$. А. Кальциевые осцилляции в сперматозоиде человека существуют для $0 < V_{catsper} < 1,05 \mu M$. $D_{ca} = 30 \mu M^2/s$. Б. Кальциевые осцилляции для $V_{CatSper} = 0,65 \mu M/s$ (черная кривая), для $V_{CatSper} = 0,25 \mu M/s$ (зеленая кривая) и для $V_{CatSper} = 0,16 \mu M/s$ (зеленая кривая). В. Типичный кальциевый сигнал (черная кривая) и его производная (красная кривая), $V_{CatSper} = 0,25 \mu M/s$

Использование абсолютных концентраций кальция вместо производной концентрации кальция по времени не обеспечивает надежность модели и зависимость траектории модели от типа кальциевого ответа

Далее мы построили две математические модели: вариант модели Каурр et al, где кривизна траектории сперматозоида контролировалась с помощью абсолютной концентрации кальция и вариант модели, где кривизна контролировалась производной кальция по времени. Результат работы кальциевого модуля модели был подставлен в уравнения, описывающие зависимость кривизны траектории сперматозоида от концентрации кальция (уравнения 2,3), и для результирующей $k_{fit}(t)$ были восстановлены траектории движения. Для оценки степени гиперактивации, для восстановленных траекторий была рассчитана фрактальная размерность (ФР)

траектории для окна траектории длиной в 1 секунду по следующей формуле[170]:

$$FD = \frac{\log(n)}{\left[\log(n) + \log\left(\frac{ld}{cd}\right)\right]} \quad (20)$$

где n – количество точек, соответствующих 1 секунде траектории, ld – расстояние между первой и последней точек фрагмента траектории длиной в 1 секунду, cd – полная длина фрагмента траектории.

Для варианта модели, где абсолютные концентрации кальция контролировали кривизну движения сперматозоидов, смещение сперматозоида от начальной точки и плотность траекторий на единицу пространства не зависели от периода колебаний кальция. Модельные траектории были сильно закольцованы и напоминали экспериментальные для субпопуляции сперматозоидов, в которых не наблюдался кальциевый ответ (Рисунок 36Д). Рассчитанная зависимость ФР восстановленной траектории сперматозоида от времени отличалась от наблюдаемой экспериментально (Рисунок 36Е).

Повышение ФР не синхронизировалось с моментами повышения концентрации кальция при кальциевых осцилляциях. Также этот вариант модели не был надежным, так как смещение и плотность траекторий сильно зависели от параметра модели C_{max} (Рисунок 37Г). Для варианта математической модели, где кривизна движения сперматозоидов зависела от производной по времени концентрации кальция, наблюдалась зависимость смещения и плотности траектории сперматозоидов от периода колебаний. Также модель была надежной: не наблюдалось зависимости качественного поведения модели от изменения параметров V_{max} и β (Рисунок 37).

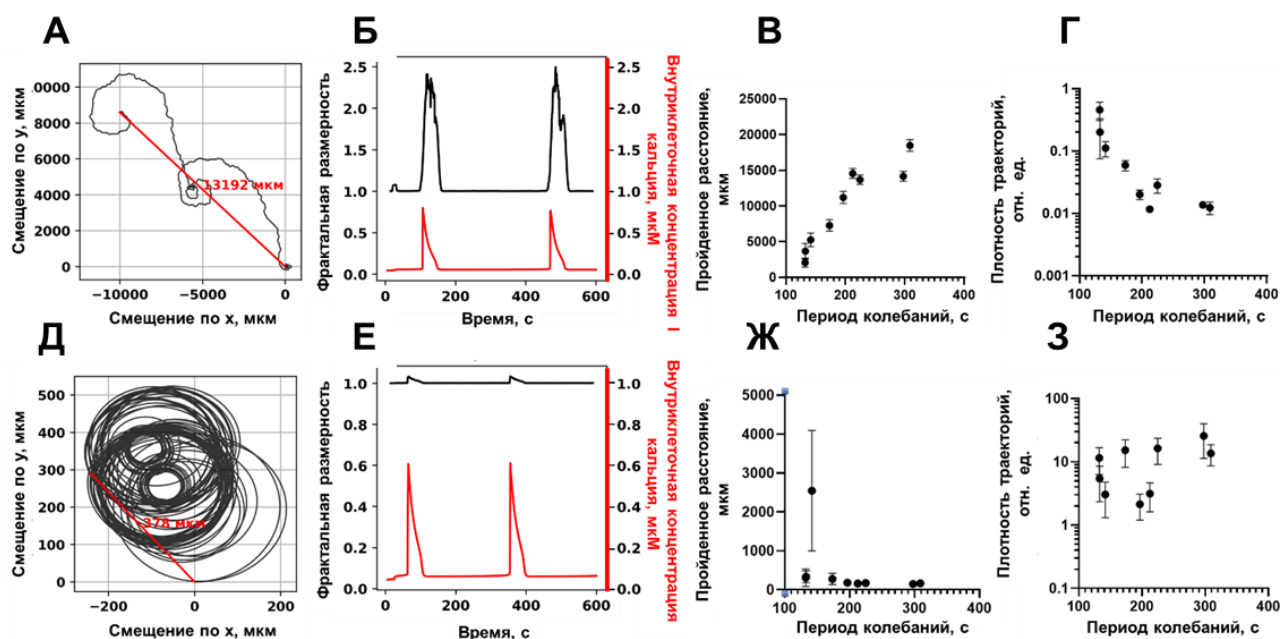


Рисунок 36 – Математическая модель подвижности сперматозоида. А-Г. Вариант модели, в котором кривизна траектории зависит от производной по времени концентрации кальция. $\beta = 0.04$ с/мм, $r_{\max} = 0.005$, $V_{\max} = 96$ мкм/с. А. Типичная траектория для периода кальциевых осцилляций $T = 300$ с. Б. Вид кальциевого ответа для периода осцилляций $T = 300$ с (красная кривая) и зависимость фрактальной размерности от времени для восстановленной траектории (черная кривая). Модель, использующая производную кальция по времени. В. Зависимость смещения сперматозоида через $t = 600$ с от периода колебаний концентрации кальция. Г. Зависимость плотности траекторий сперматозоида на единицу площади от периода колебаний концентрации кальция. Д-З. Вариант модели, в котором кривизна траектории зависит от концентрации кальция. $\beta = 0,04$ с/мм, $r_{\max} = 0,01$, $V_{\max} = 96$ мкм/с, $C_{\max} = 0,3$ мкМ. Д. Типичная траектория для периода кальциевых осцилляций $T = 300$ с. Е. Вид кальциевого ответа для периода осцилляций $T = 300$ с (красная кривая) и зависимость фрактальной размерности от времени для восстановленной траектории (черная кривая). Модель, использующая абсолютные концентрации кальция. Ж. Зависимость смещения сперматозоида через $t = 600$ с от периода колебаний концентрации кальция. З. Зависимость плотности траекторий сперматозоида на единицу площади от периода колебаний концентрации кальция

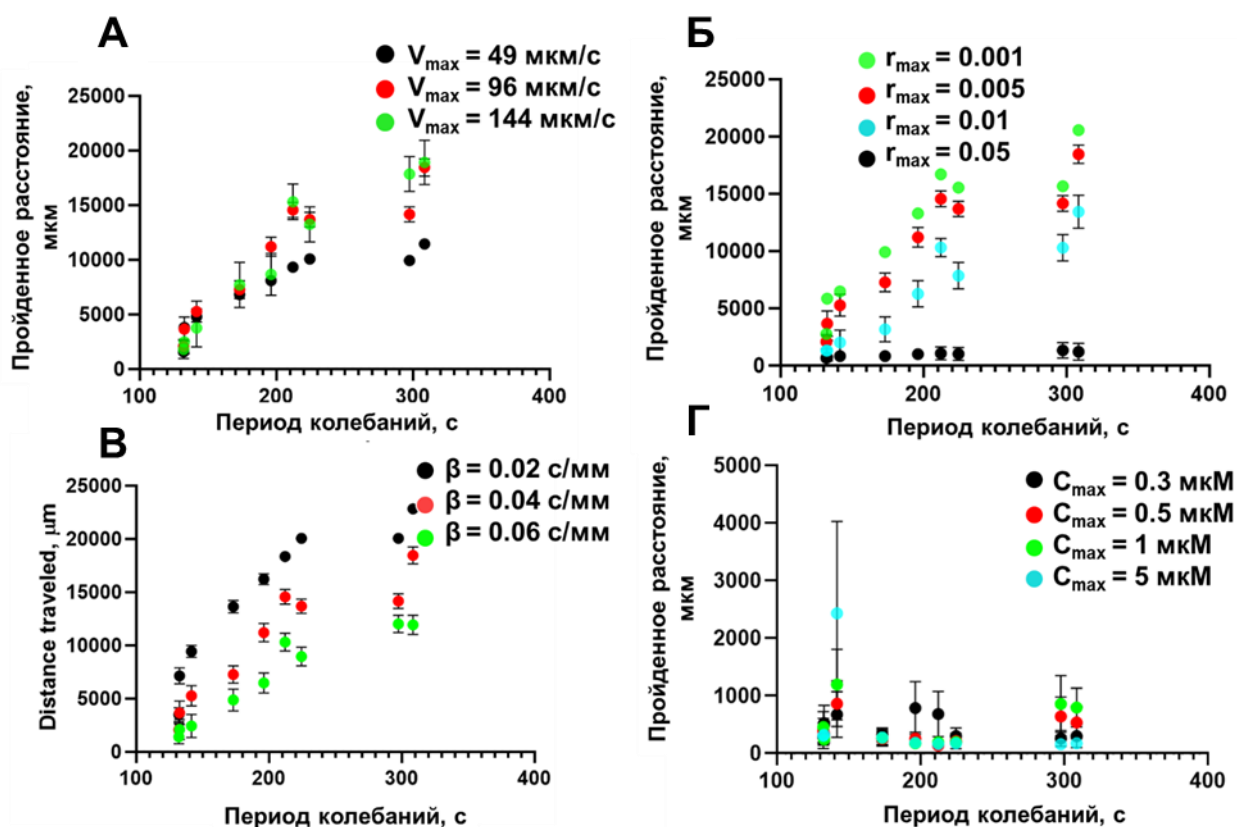


Рисунок 37 – Надежность математической модели подвижности сперматозоида. А-В. Вариант модели, в котором кривизна траектории зависит от производной по времени концентрации кальция. А. Максимальная скорость сперматозоида V_{\max} не меняет поведения модели. $\beta = 0,04$ с/мм, $\gamma_{\max} = 0,005$. Б. Уровень шума влияет на поведение модели только при $\gamma_{\max} > 0,01$. $\beta = 0,04$ с/мм, $V_{\max} = 96$ мкм/с. В. Кривизна траектории β не меняет поведения модели. $V_{\max} = 96$ мкм/с, $\gamma_{\max} = 0,005$. Г. Для любого C_{\max} , расстояние, пройденное сперматозоидом в варианте модели, где смещение зависит от абсолютной концентрации, не зависит от частоты осцилляций концентрации кальция. $V_{\max} = 96$ мкм/с, $\gamma_{\max} = 0,01$, $\beta = 0,04$ с/мм

Рассчитанная зависимость ФР восстановленной траектории сперматозоида от времени отличалась от наблюдаемой экспериментально в абсолютных величинах, однако, как и в случае эксперимента, повышение ФР соответствовало пикам концентрации кальция.

Единственным параметром, качественно менявшим результаты модели, был γ_{\max} . Увеличение коэффициента шума с 0,5% амплитуды до 10% амплитуды сигнала приводило к исчезновению зависимости смещения сперматозоида от периода кальциевых осцилляций в сперматозоиде (Рисунок 22В).

В данном варианте моделей для низкочастотных кальциевых осцилляций ($T > 300$ с) сперматозоид двигался практически по прямой (Рисунок 37), и плотность его траекторий была низкой. С уменьшением периода кальциевых осцилляций плотность траекторий росла экспоненциально (Рисунок 36Г), а смещение от начальной точки для сперматозоида резко падало (Рисунок 36В), что может соответствовать переключению типа поведения сперматозоида на поисковое.

Глава 5. Обсуждение результатов

В рамках данной работы мы использовали сочетание экспериментального исследования образцов крови от здоровых доноров и пациентов с иммунологическими нарушениями, а также анализа данных и компьютерного моделирования, чтобы определить характер и механизмы регуляции движения нейтрофилов вокруг растущих тромбов в *ex vivo* модели тромбовоспаления с использованием плоско-параллельных проточных камер.

Мы продемонстрировали, что нейтрофилы здоровых доноров преимущественно локализуются возле тромбов и движутся против потока. Эксперименты с различными белками матрикса, такими, как коллаген, фибриноген, фактор фон Виллебранда и фибронектин, а также ингибиторами интегринов показали, что движение нейтрофилов против потока требует наличия крупных растущих тромбов, а также зависит от внеклеточной концентрации кальция и активности интегринов. Предположительно, прикрепившись к поверхности, нейтрофил может «ощущать» убывающую концентрацию «хвоста» хемокина, оставляемого растущим тромбом, что естественным образом направляет его движение против потока [212, 213]. С увеличением скорости потока количество адгезированных нейтрофилов уменьшается, а количество клеток, испытывающих роллинг, возрастает. Эти результаты объясняют, почему нейтрофилы более значимы для микротромбов [216] или венозных тромбов, где скорости потока достаточно низкие для их адгезии [217].

При этом для нейтрофилов пациентов с СШД наблюдаемое поведение нейтрофилов существенно отличается. Хотя тромбы у пациентов с СШД успешно растут на коллагеновой подложке, нейтрофилы СШД движутся значительно медленнее. При этом для нейтрофилов пациентов с СШД отсутствует предпочтительная ориентация клеток против потока и расположение около растущего тромба.

Совокупность наблюдений для здоровых доноров вместе с имеющимися данными о нарушенном хемотаксисе (но не случайном движении) [15] у нейтрофилов пациентов с СШД позволяют выдвинуть предположение, что движение нейтрофилов вокруг растущего тромба является преимущественно хемотаксисом.

Для подтверждения данного предположения, мы рассчитали градиент хемоаттрактанта для экспериментально полученных изображений тромбов, запустили модельный нейтрофил [206] в этом поле и сравнили полученную траекторию с реальной.

Используя математическую модель распределения хемоаттрактантов вокруг растущего тромба и сочетая её с моделью движения нейтрофила в этом поле, мы смогли продемонстрировать, что наблюдаемое движение нейтрофилов действительно является хемотаксисом. Однако модель не смогла описать поведение 28% клеток, что указывает на необходимость учёта дополнительных факторов. Одним из направлений будущих исследований может стать включение в модель процессов адгезии, деадгезии и роллинга нейтрофилов в потоке.

Эти результаты позволяют нам предложить следующую схему участия нейтрофилов в тромбовоспалении.

Сначала эритроциты выталкивают тромбоциты и лейкоциты к поверхности, покрытой коллагеном, где они прикрепляются интегрин- и кальций-зависимым способом. Далее активированные тромбоциты выделяют хемокины; таким образом, растущий тромб постоянно выделяет хемоаттрактанты [218]. Прикрепившись к тромбу, лейкоцит движется по потоку. Далее в поле хемоаттрактантов нейтрофил движется против потока, следуя градиенту концентрации хемоаттрактанта.

Также в рамках данной работы нами были рассмотрены особенности контроля концентрацией внутриклеточного кальция подвижности нейтрофилов человека для разработанной экспериментальной модели, а также

проведено сравнение с другими клетками млекопитающих на примере сперматозоидов человека.

Было показано, что для нейтрофилов человека, в отличие от нейтрофилов мыши [90], не наблюдается связи поднятия концентрации кальция в хемотактирующем нейтрофиле с прогрессивным движением клетки или выставлением ламеллиподий. При этом в эксперименте наблюдалась связь ретракции ламеллиподии с поднятием концентрации кальция в нейтрофиле.

Данные наблюдения не согласовались с литературными данными о регуляции ветвления актина в ламеллиподиях комплексом кальций/кальмодулин/N-WASP [211]. Далее мы провели исследование роста ламеллиподий в нейтрофилах с пациентами с синдромом Вискотта-Олдрича. Экспериментально показано, что скорость роста ламеллиподии при хемотаксисе в нейтрофилах пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича не меняется по сравнению со здоровыми контролями. С помощью теоретической модели показано, что скорость роста ламеллиподии управляется не параметрами полимеризации и ветвления актиновых филаментов, а пространственным ограничением на рост филаментов со стороны плазматической мембраны. При этом скорость роста ламеллиподии нейтрофила близка к скорости полимеризации актина для нейтрофила. Вероятно, для данного режима скорость ветвления актина не является определяющим фактором для скорости роста ламеллиподий, что и объясняет отсутствие связи пиков кальция в хемотактирующем нейтрофиле с выставлением ламеллиподий и прогрессивным движением клетки.

При этом, как и в случае сперматозоидов человека, пики концентрации кальция в нейтрофилах совпадали с моментами смены направления движения клетки. В данной работе мы показали, что в сперматозоиде смена направления движения происходит в момент кальциевого пика для кальциевых осцилляций. При этом для высокочастотных кальциевых осцилляций, соответствующих более сильной активации прогестероном, резко возрастает

плотность траекторий и снижается расстояние, пройденное сперматозоидом. В данных работах было показано, что более длительный период колебаний Ca^{2+} соответствует траекториям с большим дрейфом. Напротив, более короткие периоды колебаний Ca^{2+} соответствовали более плотным поисковым схемам. Это согласуется с экспериментальными выводами и результатами математического моделирования для морских беспозвоночных [31, 32]. В данной работе такой анализ впервые был произведен для параметров движения и частот кальциевых осцилляций, характерных для сперматозоидов человека.

4.1. Итоги выполнения диссертационной работы

Экспериментальная модель движения нейтрофилов вокруг растущего тромба, разработанная в условиях цельной крови с формированием тромба на подложке из коллагена, продемонстрировала, что движение нейтрофилов у здоровых доноров статистически достоверно ориентировано к тромбам и против потока, в то время как у пациентов с синдромом Швахмана-Даймонда, для которых существуют литературные данные о нарушении хемотаксиса, такая направленность утрачивается. Математическая модель распределения хемоаттрактанта вокруг растущего тромба подтвердила наличие градиента, обеспечивающего такое движение нейтрофилов по механизму хемотаксиса.

Также показано, что такие белки, как коллаген, фибриноген, фибронектин и фактор Виллебранда поддерживают адгезию тромбоцитов и нейтрофилов, и при этом только коллаген обеспечивает полноценное формирование тромба и направленное движение нейтрофилов к нему. Кроме того, фибронектин и фибриноген плазмы крови оказались необходимы для роста тромба, а также адгезии нейтрофилов к коллагеновому матриксу и тромбу, и данная адгезия происходит интегрин- и кальций-зависимым путём.

При наблюдении кальциевой сигнализации у хемотактирующих нейтрофилов человека показано, что повышение концентрации кальция в

первую очередь отвечает за ретракцию ламеллиподий, тогда как скорость их роста, а также скорость движения клетки не зависят от высоты или частоты кальциевых пиков. Показано, что в сперматозоидах млекопитающих кальциевая сигнализация также регулирует события поворота при движении.

Отсутствие корреляции моментов выставления ламеллиподии с концентрацией внутриклеточного кальция согласуется с построенной минимальной моделью, описывающей рост ламеллиподии. При исследовании нейтрофилов пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича обнаружено, что скорость роста ламеллиподий при хемотаксисе не изменена, несмотря на дефицит в системе WASP, белка, регулирующего ветвление актина. При помощи математического моделирования было показано, что скорость роста ламеллиподий действительно не зависит от скорости ветвления актина в широких диапазонах параметров. Это указывает на то, что кальциевая регуляция N-WASP не может влиять на скорость выставления ламеллиподий.

4.2. Перспективы дальнейшего развития темы исследования

Для лучшего соответствия экспериментальной постановки реальной физиологической ситуации, в дальнейшем предполагается нанесение клеток эндотелия сосудов на поверхность модельного сосуда. Кроме того, в дальнейшем планируется использование микрофлюидных устройств с более реалистичными геометриями сосудов.

Также одним из направлений продолжения работы станет углублённое изучение внутриклеточного распределения ключевых участников сигнальных каскадов (например, IP₃-рецепторов и кальциевых каналов других типов) с помощью современных методов конфокальной микроскопии, включающее измерение локальных концентраций кальция в реальном времени, сопряжённое с системным анализом экспрессии белков кальциевой сигнализации.

Учёт турбулентности кровотока, вызванной формирующимися тромбами, может улучшить соответствие предсказаний математической модели экспериментальным данным. Также стохастическое неявное включение физиологических механизмов хемотаксиса нейтрофилов, таких как активация Mac и LFA1-интегринов, могло бы значительно улучшить модель.

ВЫВОДЫ

1. Разработана экспериментальная модель, позволяющая наблюдать движение нейтрофилов вблизи растущего тромба в плоско-параллельных проточных камерах с подложкой из фибриллярного коллагена и скоростями сдвига, характерными для венозного кровотока, а также соответствующая ей компьютерная модель, описывающая распределение хемоаттрактанта вокруг растущего тромба и движение нейтрофилов в поле хемоаттрактанта.

2. При движении нейтрофилов и сперматозоидов наблюдаются изолированные пики цитозольного уровня кальция, ассоциированные с изменением направления движения клеток.

3. Вклад хемотаксиса в наблюдаемую подвижность нейтрофилов вблизи растущего тромба является доминирующим (не менее 50% для здоровых доноров); оставшийся вклад распределяется между случайным блужданием и роллингом в зависимости от гемодинамических условий.

4. Адгезия нейтрофилов к коллагеновой подложке в наблюдаемой постановке преимущественно определяется их взаимодействием через интегрины с фибриногеном, фибронектином или фактором Виллебранда в качестве лигандов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Разработанная в рамках данной работы экспериментальная модель может использоваться для *ex vivo* анализа хемотаксиса нейтрофилов к растущему тромбу и состояния тромбовоспаления у пациентов. При этом данная модель не включает центрифугирования клеток, что приводит к упрощению экспериментального процесса и снижению повреждений, вызванных процессом выделения нейтрофилов.

Список обозначений и сокращений

2-АГ – 2-арахидоноилглицерол

ABHD2 – α/β -гидролаза 2

CatSper – катионный канал спермы

COX – циклооксигеназа

CXCR (CXC Chemokine Receptor) – рецептор к хемокинам подсемейства CXC

DAG (diacylglycerol) – диацилглицерол

DFRO (difference in Fractional Receptor Occupancy) – разность фракционной занятости рецепторов

GAP (GTPase-Activating Protein) – белок, активирующий GTP-азу

GPCR (G-Protein-Coupled Receptor) – рецептор, сопряжённый с G-белком

IL-8 (interleukin-8) – интерлейкин-8

IP3 – инозитол-1,4,5-трифосфат

IP3R – каналы-рецепторы к IP3

PGE2 – простагландин E2

PGE2 (prostaglandin E2) – простагландин E2,

PI3K (phosphoinositide 3-Kinase) – фосфатидилинозитол-3-киназа

PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) – фосфатидилинозитол 4,5-бифосфат

PLC – фосфолипаза C

PMCA – кальциевая АТФаза плазматической мембраны

RNE – redundant nuclear envelope, органелла в шейке сперматозоида

RyR (ryanodine receptor) – рианодиновый рецептор

sAC (soluble adenylate cyclase) – растворимая аденилатциклаза

SERCA – кальциевая АТФаза саркоплазматического ретикулума

SPCA – кальциевая АТФаза секреторного пути

VWF (von Willebrand Factor) – фактор Виллебранда,

WASP – белок синдрома Вискотта-Олдрича

ПКА – протеинкиназа А

СШД – синдром Швахмана-Даймонда

СШД – синдром Швахмана-Даймонда

ХА – хемоаттрактант

Библиографический список

1. Editorial: Platelets and Immune Responses During Thromboinflammation / M. Schattner, C. N. Jenne, S. Negrotto, B. Ho-Tin-Noe // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Т. 11. – Editorial. – С. 1079.
2. Jackson, S. P. Thromboinflammation: challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms / S. P. Jackson, R. Darbousset, S. M. Schoenwaelder // *Blood*. – 2019. – Vol. 133. – Thromboinflammation. – № 9. – P. 906-918.
3. Zarbock, A. Neutrophil Adhesion and Activation under Flow / A. Zarbock, K. Ley // *Microcirculation*. – 2009. – Vol. 16. – № 1. – P. 31-42.
4. Louis, N. A. Model Systems to Investigate Neutrophil Adhesion and Chemotaxis / N. A. Louis, E. Campbell, S. P. Colgan. – Текст : электронный // *Neutrophil Methods and Protocols : Methods in Molecular Biology™* / сост. J. M. Walker; ред. М. Т. Quinn [и др.]. – Totowa, NJ : Humana Press, 2007. – Т. 412. – С. 257-270. – URL: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-467-4_17 (дата обращения: 20.01.2025).
5. Inference of random walk models to describe leukocyte migration / P. J. M. Jones, A. Sim, H. B. Taylor [и др.] // *Physical Biology*. – 2015. – Т. 12. – № 6. – С. 066001.
6. Targeting thromboinflammation in antiphospholipid syndrome / D. M. Salet, S. Bekkering, S. Middeldorp, L. L. Van Den Hoogen // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2023. – Vol. 21. – № 4. – P. 744-757.
7. Keszei, M. Congenital Defects in Neutrophil Dynamics / M. Keszei, L. S. Westerberg // *Journal of Immunology Research*. – 2014. – Т. 2014. – С. 1-15.
8. Integrin Regulators in Neutrophils / S. Pulikkot, L. Hu, Y. Chen [et al.] // *Cells*. – 2022. – Vol. 11. – № 13. – P. 2025.
9. Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses / L. Wang, M. Fuster, P. Sriramarao, J. D. Esko // *Nature Immunology*. – 2005. – Vol. 6. – № 9. – P. 902-910.
10. Krause, M. Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence / M. Krause, A. Gautreau // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2014. – Vol. 15. – Steering cell migration. – № 9. – P. 577-590.
11. Ridley, A. J. Rho GTPases and cell migration / A. J. Ridley // *Journal of Cell Science*. – 2001. – Vol. 114. – № 15. – P. 2713-2722.

12. Spatiotemporal organization, regulation, and functions of tractions during neutrophil chemotaxis / M. E. Shin, Y. He, D. Li [et al.] // *Blood*. – 2010. – Vol. 116. – № 17. – P. 3297-3310.
13. Actin polymerization, calcium-transients, and phospholipid metabolism in human neutrophils after stimulation with interleukin-8 and N-formyl peptide / J. Norgauer, J. Krutmann, G. J. Dobos [и др.] // *The Journal of Investigative Dermatology*. – 1994. – Т. 102. – № 3. – С. 310-314.
14. Sjaastad, M. D. Integrin-mediated calcium signaling and regulation of cell adhesion by intracellular calcium / M. D. Sjaastad, W. J. Nelson // *BioEssays*. – 1997. – Vol. 19. – № 1. – P. 47-55.
15. The chemotaxis defect of Shwachman-Diamond Syndrome leukocytes / V. Stepanovic, D. Wessels, F. D. Goldman [et al.] // *Cell Motility*. – 2004. – Vol. 57. – № 3. – P. 158-174.
16. Ex vivo observation of granulocyte activity during thrombus formation / D. S. Morozova, A. A. Martyanov, S. I. Obydennyi [et al.] // *BMC Biology*. – 2022. – Vol. 20. – № 1. – P. 32.
17. Chemotaxis of macrophages is abolished in the Wiskott-Aldrich syndrome / Zicha, Allen, Brickell [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 1998. – Vol. 101. – № 4. – P. 659-665.
18. EFL1 mutations impair eIF6 release to cause Shwachman-Diamond syndrome / S. Tan, L. Kermasson, A. Hoslin [и др.] // *Blood*. – 2019. – Т. 134. – № 3. – С. 277-290.
19. Orelia, C. Shwachman-Diamond syndrome neutrophils have altered chemoattractant-induced F-actin polymerization and polarization characteristics / C. Orelia, T. W. Kuijpers // *Haematologica*. – 2009. – Vol. 94. – № 3. – P. 409-413.
20. Thromboinflammation Model-on-A-Chip by Whole Blood Microfluidics on Fixed Human Endothelium / A. Dupuy, L. Hagimola, N. S. A. Mgaieth [et al.] // *Diagnostics*. – 2021. – Vol. 11. – № 2. – P. 203.
21. Iglesias, P. A. Navigating through models of chemotaxis / P. A. Iglesias, P. N. Devreotes // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2008. – Vol. 20. – № 1. – P. 35-40.
22. Hundhammer, T. Paralytic Impact of Centrifugation on Human Neutrophils / T. Hundhammer, M. Gruber, S. Wittmann // *Biomedicines*. – 2022. – Vol. 10. – № 11. – P. 2896.

23. Boucek, M. M. Calcium Influx Requirement for Human Neutrophil Chemotaxis: Inhibition by Lanthanum Chloride / M. M. Boucek, R. Snyderman // *Science*. – 1976. – Vol. 193. – Calcium Influx Requirement for Human Neutrophil Chemotaxis. – № 4256. – P. 905-907.
24. Calcium signaling and regulation of neutrophil functions: Still a long way to go / J. Hann, J.-L. Bueb, F. Tolle, S. Brécharde // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2020. – Vol. 107. – Calcium signaling and regulation of neutrophil functions. – № 2. – P. 285-297.
25. Lu, H. Hybrid models of chemotaxis with application to leukocyte migration / H. Lu, K. Um, D. M. Tartakovsky // *Journal of Mathematical Biology*. – 2021. – T. 82. – № 4. – C. 23.
26. Modeling neutrophil migration in dynamic chemoattractant gradients: assessing the role of exosomes during signal relay / A. C. Szatmary, R. Nossal, C. A. Parent, R. Majumdar // *Molecular Biology of the Cell*. – 2017. – T. 28. – № 23. – C. 3457-3470.
27. Dallon, J. C. A discrete cell model with adaptive signalling for aggregation of *Dictyostelium discoideum* / J. C. Dallon, H. G. Othmer // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. – 1997. – T. 352. – № 1351. – C. 391-417.
28. Palsson, E. A model for individual and collective cell movement in *Dictyostelium discoideum* / E. Palsson, H. G. Othmer // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2000. – T. 97. – № 19. – C. 10448-10453.
29. Rieke, P. C. Application of Van Oss-Chaudhury-Good theory of wettability to interpretation of interfacial free energies of heterogeneous nucleation / P. C. Rieke // *Journal of Crystal Growth*. – 1997. – T. 182. – № 3-4. – C. 472-484.
30. Olson, S. D. Mathematical modeling of calcium signaling during sperm hyperactivation / S. D. Olson, L. J. Fauci, S. S. Suarez // *Molecular Human Reproduction*. – 2011. – Vol. 17. – № 8. – P. 500-510.
31. Olson, S. D. Fluid dynamic model of invertebrate sperm chemotactic motility with varying calcium inputs / S. D. Olson // *Journal of Biomechanics*. – 2013. – Vol. 46. – № 2. – P. 329-337.
32. The rate of change in Ca²⁺ concentration controls sperm chemotaxis / L. Alvarez, L. Dai, B. M. Friedrich [et al.] // *Journal of Cell Biology*. – 2012. – Vol. 196. – № 5. – P. 653-663.
33. Этот загадочный тромбоцит / А.О.Якименко, А.Н.Свешникова, Е.О.Артеменко, М.А.Пантелеев. – 2014. – Т. 3. – С. 33-38.

34. Platelets 4th Edition / Alan Michelson, Marco Cattaneo, Andrew Frelinger, Peter Newman. – Elsevier, 2019.
35. Systems biology insights into the meaning of the platelet's dual-receptor thrombin signaling / A. N. Sveshnikova, A. V. Balatskiy, A. S. Demianova [и др.] // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2016. – Т. 14. – № 10. – С. 2045-2057.
36. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives / A. S. Weyrich, H. Schwertz, L. W. Kraiss, G. A. Zimmerman // Journal of thrombosis and haemostasis: JTH. – 2009. – Т. 7. – Protein synthesis by platelets. – № 2. – С. 241-246.
37. Neutrophil kinetics in health and disease / C. Summers, S. M. Rankin, A. M. Condliffe [et al.] // Trends in Immunology. – 2010. – Vol. 31. – № 8. – P. 318-324.
38. Heterotrimeric G Protein Subunit G α q Is a Master Switch for G $\beta\gamma$ -Mediated Calcium Mobilization by Gi-Coupled GPCRs / E. M. Pfeil, J. Brands, N. Merten [et al.] // Molecular Cell. – 2020. – Vol. 80. – № 6. – P. 940-954.e6.
39. Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. / Z. Li, H. Jiang, W. Xie [и др.] // Science (New York, N.Y.). – 2000. – Т. 287. – № 5455. – С. 1046-1049.
40. Ruggeri, Z. M. Adhesion Mechanisms in Platelet Function / Z. M. Ruggeri, G. L. Mendolicchio // Circulation Research. – 2007. – Vol. 100. – № 12. – P. 1673-1685.
41. Italiano Jr., J. E. Selective sorting of alpha-granule proteins / J. E. Italiano Jr., E. M. Battinelli // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2009. – Vol. 7. – P. 173-176.
42. Thrombin-induced chemotaxis and aggregation of neutrophils / R. Bizios, L. Lai, J. W. Fenton, A. B. Malik // Journal of Cellular Physiology. – 1986. – Vol. 128. – № 3. – P. 485-490.
43. REGULATION OF PROTEIN FUNCTION BY GLYCOSAMINOGLYCANS—AS EXEMPLIFIED BY CHEMOKINES / T. M. Handel, Z. Johnson, S. E. Crown [et al.] // Annual Review of Biochemistry. – 2005. – Vol. 74. – № 1. – P. 385-410.
44. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium / J. Middleton, A. M. Patterson, L. Gardner [et al.] // Blood. – 2002. – Vol. 100. – Leukocyte extravasation. – № 12. – P. 3853-3860.

45. Distinct localization and function of (1,4,5)IP(3) receptor subtypes and the (1,3,4,5)IP(4) receptor GAP1(IP4BP) in highly purified human platelet membranes / S. S. El-Daher, Y. Patel, A. Siddiqua [и др.] // *Blood*. – 2000. – Т. 95. – № 11. – С. 3412-3422.
46. Clinical detection, diagnosis and treatment of morphological abnormalities of sperm flagella: A review of literature / J. Wang, W. Wang, L. Shen [и др.] // *Frontiers in Genetics*. – 2022. – Т. 13. – Clinical detection, diagnosis and treatment of morphological abnormalities of sperm flagella. – С. 1034951.
47. Linck, R. W. The axoneme: the propulsive engine of spermatozoa and cilia and associated ciliopathies leading to infertility / R. W. Linck, H. Chemes, D. F. Albertini // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2016. – Vol. 33. – The axoneme. – № 2. – P. 141-156.
48. Fritz-Laylin, L. K. The evolution of animal cell motility / L. K. Fritz-Laylin // *Current Biology*. – 2020. – Vol. 30. – № 10. – P. R477-R482.
49. Mitchell, D. R. The Evolution of Eukaryotic Cilia and Flagella as Motile and Sensory Organelles / D. R. Mitchell. – Text : electronic // *Eukaryotic Membranes and Cytoskeleton : Advances in Experimental Medicine and Biology*. – New York, NY : Springer New York, 2007. – Vol. 607. – P. 130-140. – URL: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-74021-8_11 (date accessed: 06.02.2025).
50. Pollard, T. D. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments / T. D. Pollard, G. G. Borisy // *Cell*. – 2003. – Т. 112. – № 4. – С. 453-465.
51. Insall, R. H. Actin dynamics at the leading edge: from simple machinery to complex networks / R. H. Insall, L. M. Machesky // *Developmental Cell*. – 2009. – Т. 17. – Actin dynamics at the leading edge. – № 3. – С. 310-322.
52. Kuek, L. E. First contact: the role of respiratory cilia in host-pathogen interactions in the airways / L. E. Kuek, R. J. Lee // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2020. – Vol. 319. – First contact. – № 4. – P. L603-L619.
53. Tubulin glycylation controls axonemal dynein activity, flagellar beat, and male fertility / S. Gadadhar, G. Alvarez Viar, J. N. Hansen [et al.] // *Science*. – 2021. – Vol. 371. – № 6525. – P. eabd4914.
54. Inaba, K. Calcium sensors of ciliary outer arm dynein: functions and phylogenetic considerations for eukaryotic evolution / K. Inaba // *Cilia*. – 2015. – Vol. 4. – Calcium sensors of ciliary outer arm dynein. – № 1. – P. 6.

55. Wu, L.-G. Multiple Roles of Actin in Exo- and Endocytosis / L.-G. Wu, C. Y. Chan // *Frontiers in Synaptic Neuroscience*. – 2022. – T. 14. – C. 841704.
56. Chalut, K. J. The Actin Cortex: A Bridge between Cell Shape and Function / K. J. Chalut, E. K. Paluch // *Developmental Cell*. – 2016. – Vol. 38. – The Actin Cortex. – № 6. – P. 571-573.
57. Stopp, J. Plan your trip before you leave: The neutrophils' search-and-run journey / J. Stopp, M. Sixt // *The Journal of Cell Biology*. – 2022. – T. 221. – Plan your trip before you leave. – № 8. – C. e202206127.
58. Ananthakrishnan, R. The Forces Behind Cell Movement / R. Ananthakrishnan, A. Ehrlicher // *International Journal of Biological Sciences*. – 2007. – P. 303-317.
59. Murthy, K. Myosin-II-Dependent Localization and Dynamics of F-Actin during Cytokinesis / K. Murthy, P. Wadsworth // *Current Biology*. – 2005. – Vol. 15. – № 8. – P. 724-731.
60. The kinetic mechanism of myosin V / E. M. De La Cruz, A. L. Wells, S. S. Rosenfeld [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1999. – Vol. 96. – № 24. – P. 13726-13731.
61. Comparison of Functional Characteristics of Myosin in Fast and Slow Skeletal Muscles / D. V. Shchepkin, S. R. Nabiev, N. A. Koubassova [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2020. – Vol. 169. – № 3. – P. 338-341.
62. Mogessie, B. Actin protects mammalian eggs against chromosome segregation errors / B. Mogessie, M. Schuh // *Science*. – 2017. – Vol. 357. – № 6353. – P. eaal1647.
63. Actin regulators in cancer progression and metastases: From structure and function to cytoskeletal dynamics / G. Biber, A. Ben-Shmuel, B. Sabag, M. Barda-Saad. – Text : electronic // *International Review of Cell and Molecular Biology*. – Elsevier, 2020. – Vol. 356. – Actin regulators in cancer progression and metastases. – P. 131-196. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1937644820300769> (date accessed: 06.02.2025).
64. Wrighton, K. H. The “ins” and “outs” of integrin signalling / K. H. Wrighton // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2013. – Vol. 14. – № 12. – P. 753-753.

65. Coactivation of Rac1 and Cdc42 at Lamellipodia and Membrane Ruffles Induced by Epidermal Growth Factor / K. Kurokawa, R. E. Itoh, H. Yoshizaki [et al.] // *Molecular Biology of the Cell*. – 2004. – Vol. 15. – № 3. – P. 1003-1010.
66. Hind, L. E. Leading from the Back: The Role of the Uropod in Neutrophil Polarization and Migration / L. E. Hind, W. J. B. Vincent, A. Huttenlocher // *Developmental Cell*. – 2016. – Vol. 38. – Leading from the Back. – № 2. – P. 161-169.
67. Ridley, A. J. Life at the leading edge / A. J. Ridley // *Cell*. – 2011. – T. 145. – № 7. – C. 1012-1022.
68. Chesarone, M. A. Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons / M. A. Chesarone, A. G. DuPage, B. L. Goode // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. – 2010. – T. 11. – № 1. – C. 62-74.
69. Goode, B. L. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly / B. L. Goode, M. J. Eck // *Annual Review of Biochemistry*. – 2007. – T. 76. – C. 593-627.
70. Paul, A. S. Review of the mechanism of processive actin filament elongation by formins / A. S. Paul, T. D. Pollard // *Cell Motility and the Cytoskeleton*. – 2009. – T. 66. – № 8. – C. 606-617.
71. Ojala, P. J. Identification of Yeast Cofilin Residues Specific for Actin Monomer and PIP₂ Binding / P. J. Ojala, V. Paavilainen, P. Lappalainen // *Biochemistry*. – 2001. – Vol. 40. – № 51. – P. 15562-15569.
72. The role of G protein-coupled receptor in neutrophil dysfunction during sepsis-induced acute respiratory distress syndrome / Y. Wang, C. Zhu, P. Li [и др.] // *Frontiers in Immunology*. – 2023. – T. 14. – C. 1112196.
73. PI3K Signaling in Neutrophils / P. T. Hawkins, L. R. Stephens, S. Suire, M. Wilson. – Текст : электронный // *Phosphoinositide 3-kinase in Health and Disease : Current Topics in Microbiology and Immunology* / ред. C. Rommel [и др.]. – Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2010. – Т. 346. – С. 183-202. – URL: http://link.springer.com/10.1007/82_2010_40 (дата обращения: 12.03.2025).
74. Mócsai, A. Intracellular signalling during neutrophil recruitment / A. Mócsai, B. Walzog, C. A. Lowell // *Cardiovascular Research*. – 2015. – Т. 107. – № 3. – С. 373-385.
75. Rho GTPase Rac1 is critical for neutrophil migration into the lung / M.-D. Filippi, K. Szczur, C. E. Harris, P.-Y. Berclaz // *Blood*. – 2007. – Vol. 109. – № 3. – P. 1257-1264.

76. Schmidt, S. The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies / S. Schmidt, M. Moser, M. Sperandio // *Molecular Immunology*. – 2013. – T. 55. – № 1. – С. 49-58.
77. A new variant of glycogen storage disease Type I probably due to a defect in the glucose-6-phosphate transport system / K. Narisawa, Y. Igarashi, H. Otomo, K. Tada // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1978. – Vol. 83. – № 4. – P. 1360-1364.
78. Arp2/3 complex is bound and activated by two WASP proteins / S. B. Padrick, L. K. Doolittle, C. A. Brautigam [et al.]. – Text : electronic // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – Vol. 108. – № 33. – URL: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1100236108> (date accessed: 06.02.2025).
79. Clapham, D. E. Calcium Signaling / D. E. Clapham // *Cell*. – 2007. – Vol. 131. – № 6. – P. 1047-1058.
80. Gresset, A. The phospholipase C isozymes and their regulation / A. Gresset, J. Sondek, T. K. Harden // *Sub-Cellular Biochemistry*. – 2012. – T. 58. – С. 61-94.
81. Mikoshiba, K. Role of IP3 receptor signaling in cell functions and diseases / K. Mikoshiba // *Advances in Biological Regulation*. – 2015. – Vol. 57. – P. 217-227.
82. Taylor, C. W. IP3 receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca²⁺ / C. W. Taylor, A. J. Laude // *Cell Calcium*. – 2002. – Vol. 32. – № 5-6. – P. 321-334.
83. Calmodulin regulates the disassembly of cortical F-actin in mast cells but is not required for secretion / R. Sullivan, M. Burnham, K. Török, A. Koffer // *Cell Calcium*. – 2000. – Vol. 28. – № 1. – P. 33-46.
84. Gelsolin mediates calcium-dependent disassembly of *Listeria* actin tails / L. Larson, S. Arnaudeau, B. Gibson [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2005. – Vol. 102. – № 6. – P. 1921-1926.
85. Lehne, F. Getting cells into shape by calcium-dependent actin cross-linking proteins / F. Lehne, S. Bogdan // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2023. – T. 11. – С. 1171930.
86. A polarized Ca²⁺, diacylglycerol and STIM1 signalling system regulates directed cell migration / F.-C. Tsai, A. Seki, H. W. Yang [et al.] // *Nature Cell Biology*. – 2014. – Vol. 16. – № 2. – P. 133-144.
87. Dixit, N. Chemokines, selectins and intracellular calcium flux: temporal and spatial cues for leukocyte arrest / N. Dixit, S. I. Simon. – Текст : электронный //

Frontiers in Immunology. – 2012. – Т. 3. – Chemokines, selectins and intracellular calcium flux. – URL:

<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00188/abstract> (дата обращения: 07.02.2025).

88. Spatiotemporal dynamics of calcium signals during neutrophil cluster formation / R. Khazen, B. Corre, Z. Garcia [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2022. – Vol. 119. – № 29. – P. e220385119.
89. Francis, E. A. Extension of chemotactic pseudopods by nonadherent human neutrophils does not require or cause calcium bursts / E. A. Francis, V. Heinrich // *Science Signaling*. – 2018. – Vol. 11. – № 521. – P. eaal4289.
90. TRPM2 ion channels steer neutrophils towards a source of hydrogen peroxide / H. Morad, S. Luqman, C.-H. Tan [et al.] // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 9339.
91. Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo / S. K. Yoo, T. W. Starnes, Q. Deng, A. Huttenlocher // *Nature*. – 2011. – Т. 480. – № 7375. – С. 109-112.
92. Chun, J. T. Roles of the actin-binding proteins in intracellular Ca²⁺ signalling / J. T. Chun, L. Santella // *Acta Physiologica*. – 2009. – Vol. 195. – № 1. – P. 61-70.
93. Direct effects of Ca²⁺/calmodulin on actin filament formation / M. Izadi, W. Hou, B. Qualmann, M. M. Kessels // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2018. – Т. 506. – № 2. – С. 355-360.
94. Burridge, K. Non-muscle α -actinins are calcium-sensitive actin-binding proteins / K. Burridge, J. R. Feramisco // *Nature*. – 1981. – Vol. 294. – № 5841. – P. 565-567.
95. Noegel, A. Calcium-sensitive non-muscle alpha-actinin contains EF-hand structures and highly conserved regions / A. Noegel, W. Witke, M. Schleicher // *FEBS letters*. – 1987. – Т. 221. – № 2. – С. 391-396.
96. Molecular Cloning and Characterization of Plastin, a Human Leukocyte Protein Expressed in Transformed Human Fibroblasts / C.-S. Lin, R. H. Aebersold, S. B. Kent [et al.] // *Molecular and Cellular Biology*. – 1988. – Vol. 8. – № 11. – P. 4659-4668.
97. Fimbrin is a homologue of the cytoplasmic phosphoprotein plastin and has domains homologous with calmodulin and actin gelation proteins / M. V. de Arruda, S. Watson, C. S. Lin [и др.] // *The Journal of Cell Biology*. – 1990. – Т. 111. – № 3. – С. 1069-1079.

98. Dütting, S. Fraternal twins: Swiprosin-1/EFhd2 and Swiprosin-2/EFhd1, two homologous EF-hand containing calcium binding adaptor proteins with distinct functions / S. Dütting, S. Brachs, D. Mielenz // *Cell communication and signaling: CCS*. – 2011. – T. 9. – Fraternal twins. – C. 2.
99. Mielenz, D. Physiological and pathophysiological functions of Swiprosin-1/EFhd2 in the nervous system / D. Mielenz, F. Gunn-Moore // *Biochemical Journal*. – 2016. – Vol. 473. – № 16. – P. 2429-2437.
100. Nakayama, S. Evolution of the EF-Hand Family of Proteins / S. Nakayama, R. H. Kretsinger // *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. – 1994. – Vol. 23. – № 1. – P. 473-507.
101. Chin, D. Calmodulin: a prototypical calcium sensor / D. Chin, A. R. Means // *Trends in Cell Biology*. – 2000. – T. 10. – Calmodulin. – № 8. – C. 322-328.
102. Calcium Gradients Underlying Polarization and Chemotaxis of Eosinophils / R. A. Brundage, K. E. Fogarty, R. A. Tuft, F. S. Fay // *Science*. – 1991. – Vol. 254. – № 5032. – P. 703-706.
103. Tsai, F.-C. Ca²⁺ Pulses Control Local Cycles of Lamellipodia Retraction and Adhesion along the Front of Migrating Cells / F.-C. Tsai, T. Meyer // *Current Biology*. – 2012. – Vol. 22. – № 9. – P. 837-842.
104. IP₃ and calcium signaling involved in the reorganization of the actin cytoskeleton and cell rounding induced by cigarette smoke extract in human endothelial cells / B.-H. Lin, M.-H. Tsai, C.-K. Lii, T.-S. Wang // *Environmental Toxicology*. – 2016. – T. 31. – № 11. – C. 1293-1306.
105. Roles of cAMP in regulating microtubule sliding and flagellar bending in demembrated hamster spermatozoa / M. Kinukawa, S. Oda, Y. Shirakura [et al.] // *FEBS Letters*. – 2006. – Vol. 580. – № 5. – P. 1515-1520.
106. Lindemann, C. B. Calcium regulation of flagellar curvature and swimming pattern in triton X-100-extracted rat sperm / C. B. Lindemann, J. S. Goltz // *Cell Motility*. – 1988. – Vol. 10. – № 3. – P. 420-431.
107. Suarez, S. S. Hyperactivation of mammalian sperm / S. S. Suarez, H. C. Ho // *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*. – 2003. – T. 49. – № 3. – C. 351-356.
108. Suarez, S. S. Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. / S. S. Suarez, S. M. Varosi, X. Dai // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1993. – Vol. 90. – № 10. – P. 4660-4664.

109. Liang, Y. Regulation of Flagellar Biogenesis by a Calcium Dependent Protein Kinase in *Chlamydomonas reinhardtii* / Y. Liang, J. Pan // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8. – № 7. – P. e69902.
110. Smith, E. F. Regulation of flagellar dynein by calcium and a role for an axonemal calmodulin and calmodulin-dependent kinase / E. F. Smith // Molecular Biology of the Cell. – 2002. – T. 13. – № 9. – C. 3303-3313.
111. Study on the role of calmodulin in sperm function through the enrichment and identification of calmodulin-binding proteins in bovine ejaculated spermatozoa / P. Leclerc, S. Goupil, J. Rioux [et al.] // Journal of Cellular Physiology. – 2020. – Vol. 235. – № 6. – P. 5340-5352.
112. Ho, H.-C. Hyperactivated Motility of Bull Sperm Is Triggered at the Axoneme by Ca^{2+} and Not cAMP / H.-C. Ho, K. A. Granish, S. S. Suarez // Developmental Biology. – 2002. – Vol. 250. – № 1. – P. 208-217.
113. Doerner, J. F. Ion channels and calcium signaling in motile cilia / J. F. Doerner, M. Delling, D. E. Clapham // eLife. – 2015. – T. 4. – C. e11066.
114. Dorfman, H. M. Social Behavior: A Penny for Your Shocks / H. M. Dorfman, J. W. Buckholtz // Current Biology. – 2015. – Vol. 25. – Social Behavior. – № 14. – P. R600-R601.
115. Salathe, M. Coupling of $[Ca^{2+}]_i$ and ciliary beating in cultured tracheal epithelial cells / M. Salathe, R. J. Bookman // Journal of Cell Science. – 1995. – Vol. 108. – № 2. – P. 431-440.
116. Salathe, M. Regulation of Mammalian Ciliary Beating / M. Salathe // Annual Review of Physiology. – 2007. – Vol. 69. – № 1. – P. 401-422.
117. Su, Y.-H. A flagellar K^+ -dependent Na^+ / Ca^{2+} exchanger keeps Ca^{2+} low in sea urchin spermatozoa / Y.-H. Su, V. D. Vacquier // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2002. – Vol. 99. – № 10. – P. 6743-6748.
118. Atomic structure of a voltage-dependent K^+ channel in a lipid membrane-like environment / S. B. Long, X. Tao, E. B. Campbell, R. MacKinnon // Nature. – 2007. – Vol. 450. – № 7168. – P. 376-382.
119. Global Proteome Remodeling during ER Stress Involves Hac1-Driven Expression of Long Undecoded Transcript Isoforms / K. M. Van Daltsen, S. Hodapp, A. Keskin [et al.] // Developmental Cell. – 2018. – Vol. 46. – № 2. – P. 219-235.e8.
120. Wang, S. In vivo three-dimensional tracking of sperm behaviors in the mouse oviduct / S. Wang, I. V. Larina // Development (Cambridge, England). – 2018. – T. 145. – № 6. – C. dev157685.

121. Structural specializations of the sperm tail / M. R. Leung, J. Zeng, X. Wang [et al.] // *Cell*. – 2023. – Vol. 186. – № 13. – P. 2880-2896.e17.
122. In situ cryo-electron tomography reveals the asymmetric architecture of mammalian sperm axonemes / Z. Chen, G. A. Greenan, M. Shiozaki [et al.] // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2023. – Vol. 30. – № 3. – P. 360-369.
123. Suarez, S. Hyperactivated Motility in Sperm / S. Suarez, H. Ho // *Reproduction in Domestic Animals*. – 2003. – Vol. 38. – № 2. – P. 119-124.
124. Everything you ever wanted to know about PKA regulation and its involvement in mammalian sperm capacitation / C. Baro Graf, C. Ritagliati, C. Stival [et al.] // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2020. – Vol. 518. – P. 110992.
125. Protein kinases regulate hyperactivated motility of human sperm / Y.-Y. Wang, P.-B. Sun, K. Li [и др.] // *Chinese Medical Journal*. – 2021. – Т. 134. – № 20. – С. 2412-2414.
126. The “Soluble” Adenylyl Cyclase in Sperm Mediates Multiple Signaling Events Required for Fertilization / K. C. Hess, B. H. Jones, B. Marquez [et al.] // *Developmental Cell*. – 2005. – Vol. 9. – № 2. – P. 249-259.
127. Participation of signaling proteins in sperm hyperactivation / J. Cordero-Martínez, G. E. Jimenez-Gutierrez, C. Aguirre-Alvarado [et al.] // *Systems Biology in Reproductive Medicine*. – 2022. – Vol. 68. – № 5-6. – P. 315-330.
128. Cosson, M. P. Sperm chemotaxis in siphonophores: II. calcium-dependent asymmetrical movement of spermatozoa induced by the attractant / M. P. Cosson, D. Carré, J. Cosson // *Journal of Cell Science*. – 1984. – Vol. 68. – Sperm chemotaxis in siphonophores. – № 1. – P. 163-181.
129. Carlson, A. E. External Ca²⁺ acts upstream of adenylyl cyclase SACY in the bicarbonate signaled activation of sperm motility / A. E. Carlson, B. Hille, D. F. Babcock // *Developmental Biology*. – 2007. – Т. 312. – № 1. – С. 183-192.
130. Role of forward-motility-stimulating factor as an extracellular activator of soluble adenylyl cyclase / S. Dey, D. Roy, G. C. Majumder [et al.] // *Molecular Reproduction and Development*. – 2015. – Vol. 82. – № 12. – P. 1001-1014.
131. Lishko, P. V. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm / P. V. Lishko, I. L. Botchkina, Y. Kirichok // *Nature*. – 2011. – Vol. 471. – № 7338. – P. 387-391.
132. A Specific Transitory Increase in Intracellular Calcium Induced by Progesterone Promotes Acrosomal Exocytosis in Mouse Sperm1 / A. Romarowski, C. Sánchez-Cárdenas, H. V. Ramírez-Gómez [et al.]. – Text : electronic // *Biology*

of Reproduction. – 2016. – Vol. 94. – № 3. – URL:
<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.115.136085> (date accessed: 19.09.2024).

133. Baldi, E. Nongenomic effects of progesterone on spermatozoa mechanisms of signal transduction and clinical implications / E. Baldi // *Frontiers in Bioscience*. – 1998. – Vol. 3. – № 4. – P. d1051-1059.

134. Harrison, D. A. Involvement of Protein Kinase A and A Kinase Anchoring Protein in the Progesterone-Initiated Human Sperm Acrosome Reaction1 / D. A. Harrison, D. W. Carr, S. Meizel // *Biology of Reproduction*. – 2000. – Vol. 62. – № 3. – P. 811-820.

135. Steroid induced exocytosis: The human sperm acrosome reaction / R. A. Osman, M. L. Andria, A. D. Jones, S. Meizel // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1989. – Vol. 160. – Steroid induced exocytosis. – № 2. – P. 828-833.

136. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm / T. Strünker, N. Goodwin, C. Brenker [et al.] // *Nature*. – 2011. – Vol. 471. – № 7338. – P. 382-386.

137. Carafoli, E. Intracellular Calcium Homeostasis / E. Carafoli // *Annual Review of Biochemistry*. – 1987. – T. 56. – № 1. – C. 395-433.

138. Clapham, D. E. Calcium Signaling / D. E. Clapham // *Cell*. – 2007. – T. 131. – № 6. – C. 1047-1058.

139. A united residue force-field for calcium–protein interactions / M. Khalili, J. A. Saunders, A. Liwo [et al.] // *Protein Science*. – 2004. – Vol. 13. – № 10. – P. 2725-2735.

140. Augustine, G. J. Local Calcium Signaling in Neurons / G. J. Augustine, F. Santamaria, K. Tanaka // *Neuron*. – 2003. – Vol. 40. – № 2. – P. 331-346.

141. Occurrence of Calcium Oscillations in Human Spermatozoa Is Based on Spatial Signaling Enzymes Distribution / J. Korobkin, F. A. Balabin, S. A. Yakovenko [и др.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – T. 22. – № 15. – C. 8018.

142. Konieczny, V. Spatial organization of intracellular Ca²⁺ signals / V. Konieczny, M. V. Keebler, C. W. Taylor // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2012. – Vol. 23. – № 2. – P. 172-180.

143. Wennemuth, G. Calcium Clearance Mechanisms of Mouse Sperm / G. Wennemuth, D. F. Babcock, B. Hille // *The Journal of General Physiology*. – 2003. – T. 122. – № 1. – C. 115-128.

144. The Ca²⁺ Pumps of the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus / I. Vandecaetsbeek, P. Vangheluwe, L. Raeymaekers [et al.] // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. – 2011. – Vol. 3. – № 5. – P. a004184-a004184.
145. Gunaratne, H. J. Evidence for a secretory pathway Ca²⁺-ATPase in sea urchin spermatozoa / H. J. Gunaratne, V. D. Vacquier // FEBS Letters. – 2006. – Vol. 580. – № 16. – P. 3900-3904.
146. Walweel, K. Mechanisms of SR calcium release in healthy and failing human hearts / K. Walweel, D. R. Laver // Biophysical Reviews. – 2015. – T. 7. – № 1. – C. 33-41.
147. The Trans Golgi Region is a Labile Intracellular Ca²⁺ Store Sensitive to Emetine / M.-L. Gallegos-Gómez, E. Greotti, M.-C. López-Méndez [et al.] // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 17143.
148. Release and uptake mechanisms of vesicular Ca²⁺ stores / J. Yang, Z. Zhao, M. Gu [et al.] // Protein & Cell. – 2019. – Vol. 10. – № 1. – P. 8-19.
149. Prole, D. L. Structure and Function of IP₃ Receptors / D. L. Prole, C. W. Taylor // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. – 2019. – Vol. 11. – № 4. – P. a035063.
150. Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release / J. T. Lanner, D. K. Georgiou, A. D. Joshi, S. L. Hamilton // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. – 2010. – Vol. 2. – Ryanodine Receptors. – № 11. – P. a003996-a003996.
151. Galione, A. NAADP Receptors / A. Galione // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. – 2019. – Vol. 11. – № 11. – P. a035071.
152. Shkryl, V. M. Intracellular Calcium Fluxes in Excitable Cells / V. M. Shkryl // Neurophysiology. – 2017. – Vol. 49. – № 5. – P. 384-392.
153. Berridge, M. J. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling / M. J. Berridge, M. D. Bootman, H. L. Roderick // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2003. – Vol. 4. – Calcium signalling. – № 7. – P. 517-529.
154. Berridge, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signalling / M. J. Berridge // Nature. – 1993. – Vol. 361. – № 6410. – P. 315-325.
155. Banno, Y. Characterization of partially purified phospholipase C from human platelet membranes / Y. Banno, Y. Nozawa // Biochemical Journal. – 1987. – T. 248. – № 1. – C. 95-101.

156. Regulation of inositol lipid-specific phospholipase C δ by changes in Ca²⁺ ion concentrations / V. Allen, P. Swigart, R. Cheung [et al.] // *Biochemical Journal*. – 1997. – Vol. 327. – № 2. – P. 545-552.
157. Phospholipase C δ 4 is required for Ca²⁺ mobilization essential for acrosome reaction in sperm / K. Fukami, M. Yoshida, T. Inoue [et al.] // *The Journal of Cell Biology*. – 2003. – Vol. 161. – № 1. – P. 79-88.
158. Activation of Phospholipase C δ 1 through C2 Domain by a Ca²⁺-Enzyme-Phosphatidylserine Ternary Complex / J. W. Lomasney, H.-F. Cheng, S. R. Roffler, K. King // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – Vol. 274. – № 31. – P. 21995-22001.
159. [No title found] / D. Choi, E. Lee, S. Hwang [и др.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2001. – Т. 18. – № 5. – С. 305-310.
160. Correia, J. Regulation and roles of Ca²⁺ stores in human sperm / J. Correia, F. Michelangeli, S. Publicover // *REPRODUCTION*. – 2015. – Т. 150. – № 2. – С. R65-R76.
161. Ho, H.-C. Characterization of the Intracellular Calcium Store at the Base of the Sperm Flagellum That Regulates Hyperactivated Motility1 / H.-C. Ho, S. S. Suarez // *Biology of Reproduction*. – 2003. – Vol. 68. – № 5. – P. 1590-1596.
162. Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone / M. R. Miller, N. Mannowetz, A. T. Iavarone [и др.] // *Science*. – 2016. – Т. 352. – № 6285. – С. 555-559.
163. Ke, S. The Chemosensing Role of CatSper in Mammalian Sperm: An Updated Review / S. Ke, T. Luo // *Current Issues in Molecular Biology*. – 2023. – Vol. 45. – The Chemosensing Role of CatSper in Mammalian Sperm. – № 9. – P. 6995-7010.
164. Lishko, P. V. CatSper: A Unique Calcium Channel of the Sperm Flagellum / P. V. Lishko, N. Mannowetz // *Current Opinion in Physiology*. – 2018. – Т. 2. – CatSper. – С. 109-113.
165. Rahban, R. CatSper: The complex main gate of calcium entry in mammalian spermatozoa / R. Rahban, S. Nef // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2020. – Vol. 518. – CatSper. – P. 110951.
166. Recombinant human ZP3-induced sperm acrosome reaction: Evidence for the involvement of T- and L-type voltage-gated calcium channels / O. José, O. Hernández-Hernández, M. Chirinos [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2010. – Vol. 395. – Recombinant human ZP3-induced sperm acrosome reaction. – № 4. – P. 530-534.

167. Intracellular calcium movements of boar spermatozoa during ‘in vitro’ capacitation and subsequent acrosome exocytosis follow a multiple-storage place, extracellular calcium-dependent model / M. Yeste, J. M. Fernández-Novell, L. Ramió-Lluch [et al.] // *Andrology*. – 2015. – Vol. 3. – № 4. – P. 729-747.
168. Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa / E. Baldi, R. Casano, C. Falsetti [и др.] // *Journal of Andrology*. – 1991. – T. 12. – № 5. – С. 323-330.
169. Molecular Basis of Human Sperm Capacitation / L. C. Puga Molina, G. M. Luque, P. A. Balestrini [и др.] // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2018. – T. 6. – С. 72.
170. Continuous behavioural ‘switching’ in human spermatozoa and its regulation by Ca²⁺-mobilising stimuli / C. Achikanu, J. Correia, H. A. Guidobaldi [et al.] // *Molecular Human Reproduction*. – 2019. – Vol. 25. – № 8. – P. 423-432.
171. Olson, S. D. A Model of CatSper Channel Mediated Calcium Dynamics in Mammalian Spermatozoa / S. D. Olson, S. S. Suarez, L. J. Fauci // *Bulletin of Mathematical Biology*. – 2010. – T. 72. – № 8. – С. 1925-1946.
172. Modeling of progesterone-induced intracellular calcium signaling in human spermatozoa / L.-F. Li, C. Xiang, Y.-B. Zhu, K.-R. Qin // *Journal of Theoretical Biology*. – 2014. – T. 351. – С. 58-66.
173. The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store / S. B. Herrick, D. L. Schweissinger, S. Kim [et al.] // *Journal of Cellular Physiology*. – 2005. – Vol. 202. – № 3. – P. 663-671.
174. Kaupp, U. B. Signaling in Sperm: More Different than Similar / U. B. Kaupp, T. Strünker // *Trends in Cell Biology*. – 2017. – Vol. 27. – Signaling in Sperm. – № 2. – P. 101-109.
175. Wood, C. D. Speract induces calcium oscillations in the sperm tail / C. D. Wood, A. Darszon, M. Whitaker // *The Journal of Cell Biology*. – 2003. – Vol. 161. – № 1. – P. 89-101.
176. Mata-Martínez, E. pH-dependent Ca²⁺ oscillations prevent untimely acrosome reaction in human sperm / E. Mata-Martínez, A. Darszon, C. L. Treviño // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2018. – Vol. 497. – № 1. – P. 146-152.
177. Occurrence of Calcium Oscillations in Human Spermatozoa Is Based on Spatial Signaling Enzymes Distribution / J. Korobkin, F. A. Balabin, S. A. Yakovenko [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 15. – P. 8018.

178. Chang, H. Two Distinct Ca²⁺ Signaling Pathways Modulate Sperm Flagellar Beating Patterns in Mice / H. Chang, S. S. Suarez // *Biology of Reproduction*. – 2011. – Vol. 85. – № 2. – P. 296-305.
179. Behavioural switching during oscillations of intracellular Ca²⁺ concentration in free-swimming human sperm / E. Torrezan-Nitao, H. Guidobaldi, L. Giojalas [и др.] // *Reproduction and Fertility*. – 2021. – Т. 2. – № 1. – С. L5-L7.
180. Olson, S. D. Coupling biochemistry and hydrodynamics captures hyperactivated sperm motility in a simple flagellar model / S. D. Olson, S. S. Suarez, L. J. Fauci // *Journal of Theoretical Biology*. – 2011. – Vol. 283. – № 1. – P. 203-216.
181. Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1) / T. Yoshimura, K. Matsushima, J. J. Oppenheim, E. J. Leonard // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. – 1987. – Т. 139. – Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes. – № 3. – С. 788-793.
182. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. / T. Yoshimura, K. Matsushima, S. Tanaka [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1987. – Vol. 84. – № 24. – P. 9233-9237.
183. In vitro and in vivo dependency of chemokine generation on C5a and TNF-alpha / B. J. Czermak, V. Sarma, N. M. Bless [и др.] // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. – 1999. – Т. 162. – № 4. – С. 2321-2325.
184. Chen, H.-C. Boyden Chamber Assay / H.-C. Chen. – Text : electronic // *Cell Migration* / DOI: 10.1385/1-59259-860-9:015. – New Jersey : Humana Press, 2004. – Vol. 294. – P. 015-022. – URL: <http://link.springer.com/10.1385/1-59259-860-9:015> (date accessed: 06.02.2025).
185. An improved chamber for direct visualisation of chemotaxis / A. J. Muinonen-Martin, D. M. Veltman, G. Kalna, R. H. Insall // *PloS One*. – 2010. – Т. 5. – № 12. – С. e15309.
186. Wu, J. Recent developments in microfluidics-based chemotaxis studies / J. Wu, X. Wu, F. Lin // *Lab on a Chip*. – 2013. – Vol. 13. – № 13. – P. 2484.
187. Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device / N. Li Jeon, H. Baskaran, S. K. W. Dertinger [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 2002. – Vol. 20. – № 8. – P. 826-830.

188. Kim, D. On-Chip Evaluation of Neutrophil Activation and Neutrophil–Endothelial Cell Interaction during Neutrophil Chemotaxis / D. Kim, C. L. Haynes // *Analytical Chemistry*. – 2013. – Vol. 85. – № 22. – P. 10787-10796.
189. Campbell, K. Generation of complex concentration profiles in microchannels in a logarithmically small number of steps / K. Campbell, A. Groisman // *Lab Chip*. – 2007. – Vol. 7. – № 2. – P. 264-272.
190. A Novel Microdevice for Rapid Neutrophil Purification and Phenotyping in Type 2 Diabetes Mellitus / H. M. Tay, R. Dalan, K. H. H. Li [et al.] // *Small*. – 2018. – Vol. 14. – № 6. – P. 1702832.
191. Mao, H. A sensitive, versatile microfluidic assay for bacterial chemotaxis / H. Mao, P. S. Cremer, M. D. Manson // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – Vol. 100. – № 9. – P. 5449-5454.
192. Lee, J. S. H. Electrokinetic concentration gradient generation using a converging–diverging microchannel / J. S. H. Lee, Y. Hu, D. Li // *Analytica Chimica Acta*. – 2005. – Vol. 543. – № 1-2. – P. 99-108.
193. Keller, E. F. Initiation of slime mold aggregation viewed as an instability / E. F. Keller, L. A. Segel // *Journal of Theoretical Biology*. – 1970. – T. 26. – № 3. – C. 399-415.
194. PEARSON, K. The Problem of the Random Walk / K. PEARSON // *Nature*. – 1905. – T. 72. – № 1865. – C. 294-294.
195. De Jonge, C. J. Methods for the Assessment of Sperm Capacitation and Acrosome Reaction Excluding the Sperm Penetration Assay / C. J. De Jonge, C. L. R. Barratt. – Text : electronic // *Spermatogenesis : Methods in Molecular Biology* / eds. D. T. Carrell, K. I. Aston. – Totowa, NJ : Humana Press, 2013. – Vol. 927. – P. 113-118. – URL: https://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-038-0_11 (date accessed: 06.02.2025).
196. Grynkiewicz, G. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. / G. Grynkiewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien // *The Journal of biological chemistry*. – 1985. – T. 260. – № 6. – C. 3440-3450.
197. Measurement and manipulation of [Ca²⁺]_i in suspensions of platelets and cell cultures. / P. Ohlmann, B. Hechler, J.-P. Cazenave, C. Gachet // *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). – 2004. – T. 273. – C. 229-250.
198. Aspirin for the prevention and treatment of pre-eclampsia: A matter of COX-1 and/or COX-2 inhibition? / K. M. Mirabito Colafella, R. I. Neuman, W. Visser [et al.] // *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. – 2020. –

- Vol. 127. – Aspirin for the prevention and treatment of pre-eclampsia. – № 2. – P. 132-141.
199. Virtual Cell modelling and simulation software environment / I. I. Moraru, F. Morgan, Y. Li [и др.] // *IET Systems Biology*. – 2008. – Т. 2. – № 5. – С. 352-362.
200. COPASI--a COmplex PAthway SIMulator / S. Hoops, S. Sahle, R. Gauges [и др.] // *Bioinformatics*. – 2006. – Т. 22. – № 24. – С. 3067-3074.
201. The dynamics of interleukin-8 and its interaction with human CXC receptor 1 peptide / A. A. Kendrick, M. J. Holliday, N. G. Isern [et al.] // *Protein Science*. – 2014. – Vol. 23. – № 4. – P. 464-480.
202. Thomson, A. W. The cytokine handbook / A. W. Thomson, M. T. Lotze. – 4th ed. – Amsterdam Boston : Academic Press, 2003.
203. Joshi, N. Elucidating the Molecular Interactions of Chemokine CCL2 Orthologs with Flavonoid Baicalin / N. Joshi, D. Kumar, K. M. Poluri // *ACS Omega*. – 2020. – Vol. 5. – № 35. – P. 22637-22651.
204. Platelets as Key Factors in Inflammation: Focus on CD40L/CD40 / F. Cognasse, A. C. Duchez, E. Audoux [и др.] // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Т. 13. – Platelets as Key Factors in Inflammation. – С. 825892.
205. Wang, F. The Signaling Mechanisms Underlying Cell Polarity and Chemotaxis / F. Wang // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2009. – Vol. 1. – № 4. – P. a002980-a002980.
206. Modeling neutrophil migration in dynamic chemoattractant gradients: assessing the role of exosomes during signal relay / A. C. Szatmary, R. Nossal, C. A. Parent, R. Majumdar // *Molecular Biology of the Cell*. – 2017. – Т. 28. – № 23. – С. 3457-3470.
207. Farid, H. Optimally rotation-equivariant directional derivative kernels / H. Farid, E. P. Simoncelli. – Текст : электронный // *Computer Analysis of Images and Patterns : Lecture Notes in Computer Science* / сост. G. Goos [и др.]; ред. G. Sommer [и др.]. – Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 1997. – Т. 1296. – С. 207-214. – URL: http://link.springer.com/10.1007/3-540-63460-6_119 (дата обращения: 05.02.2025).
208. Vicker, M. G. Neutrophil leucocyte chemotaxis is not induced by a spatial gradient of chemoattractant / M. G. Vicker, J. M. Lackie, W. Schill // *Journal of Cell Science*. – 1986. – Vol. 84. – № 1. – P. 263-280.

209. Schmid-Schönbein, G. W. Morphometry of human leukocytes / G. W. Schmid-Schönbein, Y. Y. Shih, S. Chien // *Blood*. – 1980. – T. 56. – № 5. – C. 866-875.
210. Dissecting thrombus-directed chemotaxis and random movement in neutrophil near-thrombus motion in flow chambers / J.-J. D. Korobkin, E. A. Deordieva, I. P. Tesakov [et al.] // *BMC Biology*. – 2024. – Vol. 22. – № 1. – P. 115.
211. WASP and N-WASP in human platelets differ in sensitivity to protease calpain / A. Shcherbina, H. Miki, D. M. Kenney [et al.] // *Blood*. – 2001. – Vol. 98. – № 10. – P. 2988-2991.
212. Modeling the interrelations between the calcium oscillations and ER membrane potential oscillations. / M. Marhl, S. Schuster, M. Brumen, R. Heinrich // *Biophysical chemistry*. – 1997. – T. 63. – № 2-3. – C. 221-39.
213. Polarized PtdIns(4,5)P₂ distribution mediated by a voltage-sensing phosphatase (VSP) regulates sperm motility / T. Kawai, H. Miyata, H. Nakanishi [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2019. – T. 116. – № 51. – C. 26020-26028.
214. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. / A. S. Weyrich, M. R. Elstad, R. P. McEver [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 1996. – Vol. 97. – № 6. – P. 1525-1534.
215. Antagonistic Roles of Human Platelet Integrin α IIb β 3 and Chemokines in Regulating Neutrophil Activation and Fate on Arterial Thrombi Under Flow / C. Schönichen, S. J. Montague, S. L. N. Brouns [et al.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2023. – Vol. 43. – № 9. – P. 1700-1712.
216. Role of microthrombus formation in the development of ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats / K. Okajima, N. Harada, S. Kushimoto, M. Uchiba // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2002. – T. 88. – № 3. – C. 473-480.
217. Wall shear rates in human and mouse arteries: Standardization of hemodynamics for in vitro blood flow assays: Communication from the ISTH SSC subcommittee on biorheology / M. A. Panteleev, N. Korin, K. D. Reesink [et al.] // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2021. – Vol. 19. – Wall shear rates in human and mouse arteries. – № 2. – P. 588-595.
218. Margraf, A. Neutrophil Recruitment: From Model Systems to Tissue-Specific Patterns / A. Margraf, K. Ley, A. Zarbock // *Trends in Immunology*. – 2019. – Vol. 40. – Neutrophil Recruitment. – № 7. – P. 613-634.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю, Свешниковой Анастасии Никитичне за ценные наставления, руководство и предоставленные возможности для профессионального роста и реализации.

Особая признательность выражается Симоненко Екатерине Юрьевне за вдумчивую критику и полезные советы, без которых эта работа не состоялась бы.

Выражается искренняя благодарность коллективу врачей, научных сотрудников и медицинских сестер ФГБУ НМИЦ ДГОИ имени Дмитрия Рогачева за предоставленные клинические данные и поддержку в исследовательской деятельности.

Выражается признательность Антонине Артемовне Болдыревой, Тесакову Ивану Павловичу, Ан Ольге Ильиничне, Таракановой Анастасии Сергеевне, Лазутовой Дарье Петровне, Мельниковой Евгении Александровне, Балабину Фёдору Алексеевичу, Мартьянову Алексею Александровичу, Корнейчук Анне Дмитриевне, Разумовой Марии Олеговне, Степанян Марии Григорьевне и Мишукову Артему Алексеевичу за долгие годы сотрудничества и плодотворные дискуссии.

Автор также хочет отдельно поблагодарить нынешних и бывших сотрудников ЦТП ФХФ РАН Болдову Анну Евгеньевну, Галкину Софию Владимировну и Адаманскую Екатерину Александровну за содержательные обсуждения, которые внесли значительный вклад в выполнение этой работы.

Особая благодарность адресуется Турыгиной Галине Ивановне, Коробкину Дмитрию Владленовичу и Медведеву Алексею Николаевичу за их неоценимую поддержку.

Наконец, автор выражает признательность Донец Алисе Евгеньевне, Дарье Александровне Болгариной, Дарье Анатольевне Серegiной, Пащенко Ирине Андреевне и Бенедикту Шереру.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Математическая модель кальциевой сигнализации в сперматозоидах

II. Уравнения модели для человека

$$\frac{\partial[ABHD^*]}{\partial t} = k_{+ABHDProg}[ABHD][Progesterone] - \frac{k_{+ABHDProg}}{K_{mABHDProg}} [ABHD^*] \quad (1)$$

$$\frac{\partial[CatSper]}{\partial t} = -k_{+CatSper}[CatSper][AG] + \frac{k_{+CatSper}}{K_{mAGCsp}} [CatSperAG] \quad (2)$$

$$\frac{\partial[ABHD]}{\partial t} = -k_{+ABHDProg}[ABHD][Progesterone] + \frac{k_{+ABHDProg}}{K_{mABHDProg}} [ABHD^*] \quad (3)$$

$$\frac{\partial[CatSperAG]}{\partial t} = k_{+CatSper}[CatSper][AG] - \frac{k_{+CatSper}}{K_{mAGCsp}} [CatSperAG] \quad (4)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial[AG]}{\partial t} = & -\frac{k_{catABHD}[AG][ABHD^*]}{\omega_{Acr}K_{mABHD-AG}+[AG]} + [AA]k_{aa} - k_{+CatSper}[CatSper][AG] + \\ & + \frac{k_{+CatSper}}{K_{mAGCsp}} [CatSperAG] \end{aligned} \quad (5)$$

$$\frac{\partial[AA]}{\partial t} = \frac{k_{catABHD}[AG][ABHD^*]}{\omega_{Acr}K_{mABHD-AG}+[AG]} - k_{AA}[AA], \quad (6)$$

где $[ABHD]$ – поверхностная концентрация неактивной ABHD2, $[ABHD^*]$ – поверхностная концентрация активной ABHD2, $[AG]$ – поверхностная концентрация арахидоилглицерола, $[AA]$ – концентрация арахидоновой кислоты, $[CatSper]$ – концентрация открытых каналов CatSper, $[CatSperAG]$ – концентрация закрытых каналов CatSper. Параметры модели даны в таблице П.1.

$$\frac{\partial[Ca_{Cyt}^{2+}]}{\partial t} = J_{RNE,leak} - J_{SPCA} - J_{PMCA} + J_{IP3r} + J_{leak} + J_{catsper} + J_{BufCyt} \quad (7)$$

$$\frac{\partial[Ca_{ER}^{2+}]}{\partial t} = J_{SPCA} - J_{RNE,leak} - J_{IP3r} + J_{BufER} \quad (8)$$

$$J_{SPCA} = \frac{V_{SPCA}[Ca_{Cyt}^{2+}]^{n_{hillspca}}}{K_{SPCA}^{n_{hillspca}} + [Ca_{Cyt}^{2+}]^{n_{hillspca}}} \quad (9)$$

$$J_{PMCA} = \frac{V_{PMCA}[Ca_{Cyt}^{2+}]^{n_{hill}}}{K_{PMCA}^{n_{hill}} + [Ca_{Cyt}^{2+}]^{n_{hill}}} \quad (10)$$

$$J_{RNE,leak} = k_{leak}([Ca_{ER}^{2+}] - [Ca_{Cyt}^{2+}]) \quad (11)$$

$$J_{leak} = k_{leakPP}, \quad (12)$$

где $[Ca_{Cyt}^{2+}]$ обозначает концентрацию цитозольного кальция, $[Ca_{ER}^{2+}]$ обозначает концентрацию кальция в RNE. J_{SPCA} - это поток кальция, опосредованный SPCA, расположенной на мембране RNE [П1]. J_{PMCA} - ток кальция, создаваемый PMCA. J_{IP3r} - ток кальция через ИЗФр, расположенные на мембране RNE, J_{leak} и $J_{RNE,leak}$ - протечки из внешней среды и депо.

$$J_{BufER} = -[CaRetSlow][Ca_{ER}^{2+}]k_{rets}^+ + [CaRetSlowCa]k_{rets}^- - [CaRetFast][Ca_{ER}^{2+}]k_{retF}^+ + [CaRetFast]k_{retF}^- \quad (13)$$

$$J_{BufCyt} = -[CaMSlow] \quad (14)$$

$$J_{BufER} = -[CaRetSlow][Ca_{ER}^{2+}]k_{rets}^+ + [CaRetSlowCa]k_{rets}^- - [CaRetFast][Ca_{ER}^{2+}]k_{retF}^+ + [CaRetFast]k_{retF}^- \quad (15)$$

$$J_{BufCyt} = -[CaMSlow][Ca_{Cyt}^{2+}]k_{MS}^+ + [CaMSlowCa]k_{MS}^- - [CaMFast][Ca_{Cyt}^{2+}]k_{MF}^+ + [CaMFast]k_{MF}^- \quad (16)$$

$$\frac{\partial [CaRetSlow]}{\partial t} = -[CaRetSlow][Ca_{ER}^{2+}]k_{+CaRetSlow} + [CaRetSlowCa] \frac{k_{+CaRetSlow}}{K_{dCaRetSlow}} \quad (17)$$

$$\frac{\partial [CaRetFast]}{\partial t} = -[CaRetFast][Ca_{ER}^{2+}]k_{+CaRetFast} + [CaRetFastCa] \frac{k_{+CaRetFast}}{K_{dCaRetFast}} \quad (18)$$

$$\frac{\partial [CaMFast]}{\partial t} = -[CaMFast][Ca_{Cyt}^{2+}]k_{+CaMFast} + [CaMFastCa]k_{-CaMFast} \quad (19)$$

$$\frac{\partial [CaMSlow]}{\partial t} = -[CaMSlow][Ca_{Cyt}^{2+}]k_{+CaMSlow} + [CaMSlowCa] \frac{k_{+CaMSlow}}{K_{dCaMSlow}} \quad (20)$$

где $[CaMSlow]$ - концентрация свободного сайта N кальмодулина, $[CaMFast]$ - концентрация свободного сайта С кальмодулина, $[CaRetSlow]$ - концентрация свободного сайта С кальретикулина, $[CaRetFast]$ - концентрация свободного сайта Р кальретикулина. $[CaMSlowCa]$ -

концентрация связанного с кальцием сайта N кальмодулина, $[CaMFastCa]$ – концентрация связанного с кальцием сайта С кальмодулина, $[CaRetSlowCa]$ – концентрация связанного с кальцием С кальретикулина, $[CaRetFast]$ – концентрация связанного с кальцием сайта Р кальретикулина.

$$P_0 = P_{40} + P_{30} = w_{110}^4 + 4w_{110}^3(1 - w_{110}) \quad (21)$$

$$w_{110} = \frac{[IP3] [Ca_{Cyt}^{2+}]_1}{K_1 K_5 Z} \quad (22)$$

$$Z = 1 + \frac{[Ca_{RNE}^{2+}]}{K_4} + \frac{[Ca_{RNE}^{2+}]}{K_5} + \frac{[Ca_{RNE}^{2+}][IP3]}{K_4 K_5} + \frac{[IP3]}{K_1} + \frac{[IP3][Ca_{RNE}^{2+}]}{K_1 K_2} + \frac{[IP3][Ca_{RNE}^{2+}]}{K_1 K_5} + \frac{[IP3][Ca_{RNE}^{2+}][Ca_{RNE}^{2+}]}{K_1 K_2 K_5} \quad (22)$$

где P_0 – вероятность открытия IP3R, w_{110} – вероятность открытия одной субъединицы IP3R (см. модель де Юнга-Кайзера [П2]).

$$\frac{\partial [IP3]}{\partial t} = J_{plc} - J_{IP3K} \quad (23)$$

$$J_{IP3K} = \frac{V_{IP3K}[IP3]}{K_{IP3K} + [IP3]} \quad (24)$$

$$J_{plc} = \frac{V_{PLC}[Ca_{Cyt}^{2+}]}{K_{PLC} + [Ca_{Cyt}^{2+}]} \quad (25)$$

где $[IP3]$ – молярная концентрация IP₃. J_{IP3K} – скорость деградации IP₃ инозитолтрифосфат киназой (IP3К). J_{plc} – скорость производства IP₃ PLCδ.

Параметры модели даны в таблице П.2.

$$\frac{\partial [IP3]}{\partial t} = \begin{cases} J_{plc} - J_{IP3K} + D_{IP3}\Delta[IP3], & M \in \text{Шейка} \\ D_{IP3}\Delta[IP3] - J_{IP3K}, & M \notin \text{Шейка} \end{cases} \quad (26)$$

Кальциевая АТФаза PMCA и канал CatSper присутствуют только в жгутике сперматозоида:

$$J_{PMCA} = \begin{cases} \frac{V_{PMCA}[Ca_{Cyt}^{2+}]^{n_{hill}}}{K_{PMCA}^{n_{hill}} + [Ca_{Cyt}^{2+}]^{n_{hill}}}, & x \in \text{Жгуттик} \\ 0, & x \notin \text{Жгуттик} \end{cases} \quad (27)$$

$$J_{CatSper} = \begin{cases} P_{CatSper} V_{CatSper}, & x \in \text{Жгуттик} \\ 0, & x \notin \text{Жгуттик} \end{cases} \quad (28)$$

П2. Уравнения модели для мышцы

Первый модуль состоит из 11 уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{\partial [Prog_{in}]}{\partial t} &= D_{prog}([Prog] - [Prog_{in}]) + \\ &+ D_{prog}\Delta[Prog_{in}] \end{aligned} \quad (29)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial [AA]}{\partial t} &= \frac{k_{catABHD}[AG][ABHD2^*]}{\omega_{Acr}K_{mABHD-AG} + [AG]} - k_{AA}[AA] - \\ &- k_{COX}N_{COX}[AA] + D_{AA}\Delta[AA] \end{aligned} \quad (30)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial [PGE2]}{\partial t} &= \frac{k_{-GPCR}[GPCRact]}{\omega_{Cyt}} + \frac{k_{COX}N_{COX}[AA]}{\omega_{Cyt}} - k_{degPGE}[PGE2] + \\ &+ D_{AA}\Delta[PGE2] - k_{-GPCR}[GPCR][PGE2]/(\omega_{Cyt}K_{dGPCR}) \end{aligned} \quad (31)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial [ABHD^*]}{\partial t} &= k_{+ABHDProg}[ABHD2][Progesterone_{in}] - k_{-ABHDProg}[ABHD2^*] + \\ &+ D_{Prot}\Delta[ABHD2^*] \end{aligned} \quad (32)$$

$$\frac{\partial [AG]}{\partial t} = -\frac{k_{catABHD}[AG][ABHD2^*]}{\omega_{Acr}K_{mABHD-AG} + [AG]} + k_{AA}[AA] + D_{AA}\Delta[AG] \quad (33)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial [GPCRact]}{\partial t} &= k_{-GPCR}[GPCR][PGE2]/K_{dGPCR} - k_{-GPCR}[GPCRact] - \\ &- k_{intern}[GPCRact] + D_{Prot}\Delta[GPCRact] \end{aligned} \quad (34)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial [GPCR]}{\partial t} &= -k_{-GPCR}[GPCR][PGE2]/K_{dGPCR} + k_{-GPCR}[GPCRact] + \\ &+ D_{Prot}\Delta[GPCR] \end{aligned} \quad (35)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial [\beta\gamma]}{\partial t} &= k_{diss}[GPCRact] \frac{\omega_{Cyt}M - [\beta\gamma]}{\omega_{Cyt}K_{G2} + (\omega_{Acr}M - [\beta\gamma])} - k_{G1}[\beta\gamma]([\beta\gamma] - [G\alpha^{GTP}]) + \\ &+ D_{Prot}\Delta[\beta\gamma] \end{aligned} \quad (36)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial [G\alpha^{GTP}]}{\partial t} &= k_{diss}[GPCRact] \frac{\omega_{Cyt}M - [\beta\gamma]}{\omega_{Cyt}K_{G2} + (\omega_{Acr}M - [\beta\gamma])} - \\ &- k_{hydr}\omega_{Cyt}[GAP] \frac{[G\alpha^{GTP}]}{\omega_{Cyt}K_{G3} + [G\alpha^{GTP}]} + D_{Prot}\Delta[G\alpha^{GTP}] \end{aligned} \quad (37)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial [PLC\beta act]}{\partial t} &= -[PLC\beta act]k_{DActPLC} + k_a[G\alpha^{GTP}][PLC\beta] + \\ &+ D_{prot}\Delta[PLC\beta act] \end{aligned} \quad (38)$$

$$\frac{\partial [PLC\beta]}{\partial t} = [PLC\beta act]k_{DActPLC} - k_a[G\alpha^{GTP}][PLC\beta] + D_{prot}\Delta[PLC\beta] \quad (39)$$

Сумма скоростей в правых частях (10) и (11) дает ноль, поэтому для гомогенной системы одно из уравнений можно отбросить.

Полученная система уравнений была упрощена путем исследования иерархии характерных времен и редукции с применением теоремы Тихонова до 9 уравнений. Сначала было произведено обезразмеривание переменных:

$$PLC\beta_s = \frac{[PLC\beta]}{PLC\beta_{avg}}, \quad PLC\beta_{ACT_s} = \frac{[PLC\beta_{act}]}{PLC\beta_{ACT_{avg}}}, \quad \beta\gamma_s = \frac{[\beta\gamma]}{\beta\gamma_{avg}}, \quad G\alpha^{GTP}_s = \frac{[G\alpha^{GTP}]}{G\alpha^{GTP}_{avg}},$$

$$GPCR_{act_s} = \frac{[GPCR_{act}]}{GPCR_{act_{avg}}}, \quad GPCR_s = \frac{[GPCR]}{GPCR_{avg}}, \quad AG_s = \frac{[AG]}{AG_{avg}}, \quad AA_s = \frac{[AA]}{AA_{avg}}, \quad PGE2_s =$$

$$\frac{[PGE2]}{PGE2_{avg}}, \quad ABHD2_s = \frac{[ABHD2]}{ABHD2_{avg}}, \quad ABHD2^*_s = \frac{[ABHD2^*]}{ABHD2^*_{avg}}.$$

Значения с индексом $_{avg}$ соответствуют средним за период активации значениям переменных.

Численные значения даны в Таблице П.5.

В обезразмеренную систему были подставлены численные значения для констант, и она была переписана в виде $\frac{dp_s}{dt} = A^S O(1)$. Полученные значения

для коэффициентов A^S соотносились следующим образом: $A^{AA} \ll A^{AG} \sim A^{G\alpha^{GTP}} \ll A^{CaMSlow} \ll A^{GPCR} \ll A^{ABHD2}$. При применении

квазистационарного приближения для $ABHD2$, модель полностью сохраняла свое поведение (Рисунок 31В). В конечных расчетах концентрации $ABHD2$ и $ABHD2^*$ задавались следующими выражениями:

$$[ABHD2^*] = [ABHD2]_0 - [ABHD2] \quad (40)$$

$$[ABHD2] = k_{-ABHDProg}([ABHD2]_0)/(k_{+ABHDProg}[Progesterone_{in}] + k_{-ABHDProg}) \quad (41)$$

Во втором модуле на вход подавалась активность PLC следующим

выражением: $[PLC\beta_{act}] = 8e^{\frac{-(t-600)^2}{250^2}} / \text{мкм}^2$. Активность $PLC\delta_4$ описывалась как кальций-зависимый поток IP_3 в цитозоль аналогично сперматозоидам человека – уравнение (25). Второй модуль состоит из 8 уравнений.

Обозначения переменных модели указаны в Таблице П.4. Обозначения параметров модели указаны в Таблице П.5.

$$\frac{\partial[Ca_{Cyt}^{2+}]}{\partial t} = J_{Acr,leak} - J_{SPCA} - J_{PMCA} + J_{IP3r} + J_{leak} + J_{BufCyt} + D_{Ca}\Delta[Ca_{Cyt}^{2+}] \quad (42)$$

$$\frac{d[Ca_{Acr}^{2+}]}{dt} = J_{SPCA} - J_{RNE,leak} - J_{IP3r} + J_{BufER} \quad (43)$$

$$J_{SPCA} = \begin{cases} \frac{V_{SPCA}[Ca_{Cyt}^{2+}]^2}{K_{SPCA}^2 + [Ca_{Cyt}^{2+}]^2}, \vec{x} \in \text{Мембрана акросомы} \\ 0, \vec{x} \notin \text{Мембрана акросомы} \end{cases} \quad (44)$$

$$J_{PMCA} = \begin{cases} \frac{V_{PMCA}[Ca_{Cyt}^{2+}]^2}{K_{PMCA}^2 + [Ca_{Cyt}^{2+}]^2}, \vec{x} \in \text{Жгуттик} \\ 0, \vec{x} \notin \text{Жгуттик} \end{cases} \quad (45)$$

$$J_{Acr,leak} = \begin{cases} k_{leak}([Ca_{Acr}^{2+}] - [Ca_{Cyt}^{2+}]), \vec{x} \in \text{Мембрана акросомы} \\ 0, \vec{x} \notin \text{Мембрана акросомы} \end{cases} \quad (46)$$

$$J_{leak} = \begin{cases} k_{leakPP}, \vec{x} \in \text{Жгуттик} \\ 0, \vec{x} \notin \text{Жгуттик} \end{cases} \quad (47)$$

$$J_{IP3r} = \begin{cases} N_{IP3}k_{IP3}P_0([Ca_{Acr}^{2+}] - [Ca_{Cyt}^{2+}]), \vec{x} \in \text{Мем. акросомы} \\ 0, \vec{x} \notin \text{Мембрана акросомы} \end{cases} \quad (48)$$

где $P_0 = m_\infty^3 h^3$ – вероятность пребывания IP_3R в открытом состоянии, определяемая согласно модели Ли-Ринзела [ПЗ], h – доля каналов, не инактивированных кальцием:

$$\frac{dh}{dt} = \frac{h_\infty - h}{\tau_h} \quad (49)$$

$$\text{где } \tau_h = \frac{1}{a_2(Q_2 + [Ca_{Cyt}^{2+}])}, \quad m_\infty = \left(\frac{[IP_3]}{[IP_3] + K_1} \right) \left(\frac{[Ca_{Cyt}^{2+}]}{[Ca_{Cyt}^{2+}] + K_5} \right), \quad h_\infty = \frac{Q_2}{Q_2 + [Ca_{Cyt}^{2+}]}, \quad Q_2 =$$

$$K_2 \frac{[IP_3] + K_1}{[IP_3] + K_3}$$

$$J_{BufER} = -[CaRetSlow][Ca_{Acr}^{2+}]k_{retS}^+ + [CaRetSCa]k_{retS}^- - \\ - [CaRetFast][Ca_{Acr}^{2+}]k_{retF}^+ + [CaRetFast]k_{retF}^- \quad (50)$$

$$J_{BufCyt} = -[CaMSlow][Ca_{Cyt}^{2+}]k_{MS}^+ + [CaMSCa]k_{MS}^- - \\ - [CaMFast][Ca_{Cyt}^{2+}]k_{MF}^+ + [CaMFast]k_{MF}^- \quad (51)$$

где J_{SPCA} – это поток через SPCA, J_{PMCA} – поток через PMCA, J_{IP3r} – поток через IP_3R , J_{leak} и $J_{RNE,leak}$ – утечки из внешней среды и депо.

$$\begin{aligned} \frac{d[CaRetSlow]}{dt} = & -[CaRetSlow][Ca_{Acr}^{2+}]k_{+CaRetSlow} + \\ & + [CaRetSCa] \frac{k_{+CaRetSlow}}{K_{dCaRetSlow}} \end{aligned} \quad (52)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[CaRetFast]}{dt} = & -[CaRetFast][Ca_{Acr}^{2+}]k_{+CaRetFast} + \\ & + [CaRetFCa] \frac{k_{+CaRetFast}}{K_{dCaRetFast}} \end{aligned} \quad (53)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[CaMFAST]}{dt} = & -[CaMFAST][Ca_{Cyt}^{2+}]k_{+CaMFAST} + \\ & + [CaMFCa]k_{-CaMFAST} \end{aligned} \quad (54)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[CaMSlow]}{dt} = & -[CaMSlow][Ca_{Cyt}^{2+}]k_{+CaMSlow} + \\ & + [CaMSCa] \frac{k_{+CaMSlow}}{K_{dCaMSlow}} \end{aligned} \quad (55)$$

$$\frac{\partial [IP3]}{\partial t} = J_{PLC\beta} - J_{IP5pp} + J_{plcd} + D_{IP3}\Delta[IP3], \quad (56)$$

$$J_{PLC\delta} = \begin{cases} \frac{N_{PLC\delta}k_{PLC}[Ca_{Cyt}^{2+}]}{N_{AV_{Cyt}}(K_{PLC} + [Ca_{Cyt}^{2+}])}, & \vec{x} \in \text{Головка} + \text{шейка} \\ 0, & \vec{x} \notin \text{Головка} + \text{шейка} \end{cases} \quad (57)$$

$$J_{PLC\beta} = \begin{cases} [PLC\beta act]k_{PLC}, & \vec{x} \in \text{Головка} + \text{шейка} \\ 0, & \vec{x} \notin \text{Головка} + \text{шейка} \end{cases} \quad (58)$$

$$J_{IP5pp} = \frac{N_{IP5pp}k_{IP5pp}[IP3]}{N_{AV_{Cyt}}(K_{IP5pp} + [IP3])} \quad (59)$$

где J_{IP5pp} – скорость деградации IP_3 инозитол 5-фосфатазой ($IP5pp$), $J_{PLC\delta}$ – скорость производства IP_3 $PLC\delta$; $J_{PLC\beta}$ – скорость производства IP_3 $PLC\beta$.

Полученная система из 8 уравнений была упрощена с помощью исследования иерархии времен путем применения теоремы Тихонова до 7 уравнений.

Сначала было произведено обезразмеривание переменных:

$$IP3_s = \frac{[IP3]}{IP3_{avg}}, \quad Ca_{Cyt}^{2+}_s = \frac{[Ca_{Cyt}^{2+}]}{Ca_{Cyt}^{2+}_{avg}}, \quad Ca_{Acr}^{2+}_s = \frac{[Ca_{Acr}^{2+}]}{Ca_{Acr}^{2+}_{avg}}, \quad CaRetSlow_s = \frac{[CaRetSlow]}{CaRetSlow_{avg}},$$

$$CaRetFast_s = \frac{[CaRetFast]}{CaRetFast_{avg}}, \quad CaMSlow_s = \frac{[CaMSlow]}{CaMSlow_{avg}}, \quad CaMFAST_s = \frac{[CaMFAST]}{CaMFAST_{avg}}$$

Значения с индексом $_{avg}$ соответствуют средним за период активации значениям переменных. Численные значения даны в Таблице П.6. В обезразмеренную систему были подставлены численные значения для

констант, и уравнения переписаны в виде $\frac{dp_s}{dt} = A^S O(1)$. Результирующие значения для коэффициентов A^S соотносились следующим образом:

$$A^{IP3} \sim A^{CaRetSlow} \sim A^{CaRetFast} \ll A^{CaMSlow} \ll A^{CaRNE} \sim A^{CaMFast} \ll A^{CaCyt}$$

П3. Параметры модели

Таблица П.1. Параметры первого модуля модели кальциевой сигнализации в сперматозоидах человека

Параметр	Значение	Источник	Комментарий
$k_{cat_{ABHD}}$	10	[П4]	Каталитическая константа для ABHD2
$K_{m_{ABHD-AG}}$	12 μ M	[П5]	Аффинность ABHD2 к 2-АГ
$N_{CatSper}$	100	[П6]	Начальное количество каналов CatSper
$K_{m_{AGCsp}}$	0,67	[П7]	Константа диссоциации комплекса 2-АГ-CatSper
$k_{+ABHDProg}$	3	Подбор	k_{+} для связывания прогестерона и ABHD2
$K_{m_{ABHDProg}}$	16	[П7]	Аффинность ABHD2 к прогестерону
$k_{+CatSper}$	10	Подбор	Скорость присоединения 2-АГ к CatSper
k_{AA}	0.001	[П7]	Скорость генерации 2-АГ мембраной
$ABHD_0$	100	[П6]	Начальное количество молекул ABHD2
$2AG_0$	0,7 μ M	[П7]	Начальная концентрация 2-АГ

Таблица П.2. Параметры модуля кальциевой сигнализации

Параметр	Значение	Источник	Комментарий
K1	0,13 μM	[П2]	Параметр IP3R
K2	30 μM	[П8]	Параметр IP3R
K3	0,003 μM	[П8]	Параметр IP3R
K5	0,13 μM	[П8]	Параметр IP3R
V _{sPCA}	0,7 μM	[П9]	Скорость SPCA
K _{sPCA}	0,27 μM	[П10]	Аффинность SPCA к кальцию
k _{leak}	0,0028	Подбор	Коэффициент протечки из RNE
k _{IP3}	0.00007 ($\mu\text{M} \times \text{s}$) ⁻¹	[П11]	Ток через 1 открытый IP3R
k _{leakPP}	0.15 $\mu\text{M/s}$	[П10]	Протечка кальция в цитозоль
K _{PLC}	0,7 μM	[П12]	Аффинность к кальцию PLC δ
k _{PLC}	0,3 $\mu\text{M/s}$	[П13]	Каталитическая константа PLC δ
N _{PLC}	2600	[П6]	Количество PLC δ
N _{IP3}	2500	[П6]	Количество IP3R
k _{IP3deg}	1,33	[П12]	Скорость деградации IP ₃
K _{IP3K}	0,7 μM	[П14]	Аффинность IP ₃ к IP3R
N _{CaRet}	54000	[П6]	Количество IP ₃
N _{CaRetSlow}	N _{CaRetSlow} ×18	[П15]	Емкость сайта С кальретикулина
N _{CaRetFast}	N _{CaRetSlow} ×2	[П15]	Емкость сайта Р кальретикулина
k _{+CaRetSlow}	0.1 ($\mu\text{M} \times \text{s}$) ⁻¹	[П16]	Скорость ассоциации сайта С с кальцием
K _{dCaRetSlow}	2000 μM	[П16]	Константа диссоциации сайта С и кальция
k _{+CaRetFast}	0,05	Подбор	Скорость ассоциации сайта Р с кальцием
K _{dCaRetFast}	1 μM	[П17]	Константа диссоциации сайта Р и кальция
N _{CaM}	54000	[П6]	Количество молекул кальмодулина

Продолжение таблицы П.2

Параметр	Значение	Источник	Комментарий
$N_{CaMSlow}$	$N_{CaM} \times 2$	[П16]	Емкость сайта N кальмодулина
$N_{CaMFast}$	$N_{CaM} \times 2$	[П16]	Емкость сайта С кальмодулина
$k_{+CaMSlow}$	10 s^{-1}	[П18]	Скорость ассоциации сайта С кальмодулина с кальцием
$K_{dCaMSlow}$	$1 \text{ }\mu\text{M}$	[П16]	Константа диссоциации сайта С кальмодулина и кальция
$k_{+CaMFast}$	100 $(\mu\text{M} \times \text{s})^{-1}$	[П18]	Скорость ассоциации сайта N кальмодулина с кальцием
$k_{-CaMFast}$	500 s^{-1}	[П18]	Скорость диссоциации сайта N кальмодулина с кальцием
V_{pmca}	$1 \text{ }\mu\text{M}$	[П19]	Максимальная скорость РМСА
K_{pmca}	$0,19 \text{ }\mu\text{M}$	[П19]	Константа полуактивации РМСА
$CaER_0$	$800 \text{ }\mu\text{M}$	[П20]	Начальная концентрация кальция в депо
$CaIn_0$	$0,1 \text{ }\mu\text{M}$	[П20]	Начальная концентрация кальция в цитозоли
$V_{CatSper}$	$0,7 \text{ }\mu\text{M}/\text{c}$	Подбор	Максимальный ток через CatSper
D_{IP_3}	$8 \text{ }\mu\text{m}^2/\text{c}$	[П21]	Коэффициент диффузии IP_3
$P_{CatSper}$		Подбор	Вероятность открытия CatSper

Таблица П.3. Геометрия модели кальциевой сигнализации в сперматозоидах

Название компартмента	Уравнение, задающее границы компартмента	Обозначение, объем	Обозначение, площадь мембраны	Источник
Акросома	Полуэллипс, заданный уравнением: $(((((((0.7 \times x) - (0.7 \times 36.0))^2) + (2.0 \times ((y - 5.0)^2)) + ((2.0 \times z) - 10.0)^2)) < 1.21) \times (x > 34.0) \times (z < 5.0)$	$V_{acr}, 1.3 \text{ мкм}^3$	$S_{acr}, 9.6 \text{ мкм}^2$	[П22]
Цитозоль	<p>Жгутик сперматозоида: цилиндр, заданный уравнением</p> $((x \geq -89.0) \times (x \leq 14.0) \times (((y - 5.0)^2) + ((z - 5.0)^2)) < (0.3^2))$ <p>Головка сперматозоида:</p> <p>Полуэллипс,</p> $((((0.4 \times x) - (0.4 \times 35.0))^2) + (((1.3 \times y) - (1.3 \times 5.0))^2) + (((2.0 \times z) - 10.0)^2)) < 3.0)$ <p>Шейка сперматозоида:</p> <p>Цилиндр</p> $((x \geq 14.0) \times (x \leq 34.0) \times (((y - 5.0)^2) + ((z - 5.0)^2)) < (0.4^2))$	$V_{cyt}, 56 \text{ мкм}^3$	$S_{cyt}, 283 \text{ мкм}^2$	[П23]

Таблица П.4. Начальные значения переменных (поверхностные концентрации для мембранных веществ, объемные концентрации для растворенных веществ; соответствуют базальным для всего, кроме кальция) и коэффициенты диффузии (для трехмерной модели)

Название вещества	Обозначение переменной	Компартмент	Начальные значения		Коэффициент диффузии в 3D модели, мкм ² /с		
			Значение	Ссылка	Обозначение	Значение	Ссылка
Арахидоновая кислота	[AA]	Мембрана акросомы	0 / мкм ²	–	D _{AA}	1	[П24]
PGE2	[PGE2]	Цитозоль	0 мкМ	–	D _{AA}	1	[П24]
Прогестерон в цитозоли	[Prog _{in}]	Цитозоль	0 мкМ	–	D _{Prog}	0.1	Подбор
ABHD2, неактивная	[ABHD2]	Мембрана акросомы	17 / мкм ²	[П24]	D _{prot}	2	[П24]
ABHD2, активная	[ABHD2*]	>>	0 / мкм ²	–	D _{prot}	2	[П24]
2-AG*	[AG]	>>	1171 / мкм ²	См. КОММ.	D _{AA}	1	[П24]
βγ-субъединица G-белка	[βγ]	Мембрана	0 / мкм ²	–	D _{prot}	2	Оценка см. [П24]
Активный GPCR	[GPCRact]	>>	0 / мкм ²	-	D _{prot}	2	-
Неактивный GPCR**	[GPCR]	>>	111 / мкм ²	См. КОММ.	D _{prot}	2	Оценка см. [П24]
α-субъединица G-белка с GTP	[Gα ^{GTP}]	>>	0 мкМ	–	D _{prot}	2	-

Название вещества	Обозначение переменной	Компартмент	Начальные значения		Коэффициент диффузии в 3D модели, мкм ² /с		
			Значение	Ссылка	Обозначение	Значение	Ссылка
Кальретикулин, свободный медленный сайт***	[CaRetSlow]	Акросома	2.8 мМ	См. КОММ.	–	–	–
Кальретикулин, медленный сайт с кальцием	[CaRetSCa]	>>	0 мкМ	–	–	–	–
Кальретикулин, свободный быстрый сайт****	[CaRetFast]	>>	311 мкМ	–	–	–	–
Кальретикулин, быстрый сайт с кальцием	[CaRetFCa]	>>	0 мкМ	–	–	–	–
Кальмодулин, свободный медленный сайт*****	[CaMSlow]	Цитозоль	4.9 мкМ	См. КОММ.	D _{Ca}	10–170	Подбор
Кальмодулин, медленный сайт с кальцием	[CaMSCa]	>>	0 мкМ	–	D _{Ca}	10–170	Подбор
Кальмодулин, свободный быстрый сайт*****	[CaMFast]	>>	4.9 мкМ	См. КОММ.	D _{Ca}	10–170	Подбор
Кальмодулин, быстрый сайт с кальцием	[CaMFCa]	Цитозоль	0 мкМ	–	D _{Ca}	10–170	Подбор
IP ₃	[IP3]	>>	0 мкМ	[П21]	D _{IP3}	10.0	Подбор

Название вещества	Обозначение переменной	Компартмент	Начальные значения		Коэффициент диффузии в 3D модели, мкм ² /с		
			Значение	Ссылка	Обозначение	Значение	Ссылка
Кальций в цитозоле	$[Ca_{Cyt}^{2+}]$	>>	0.1 мкМ	[П20]	D_{Ca}	10–170	Подбор
Кальций в акросоме	$[Ca_{Acr}^{2+}]$	Акросома	256 мкМ	[П20]	–	–	–
Активированная $PLC\beta$	$[PLC\beta_{act}]$	Мембрана	0 / мкм ²	–	D_{prot}	2	Оценка см. [П24]
Неактивная $PLC\beta$ *****	$[PLC\beta]$	>>	177 / мкм ²	См. КОММ	D_{prot}	2	Оценка см. [П24]

* Рассчитывается как $2AG_{Vol0} \times N_a \frac{V_{acr}}{S_{acr}}$. Для $2AG_{Vol0}$ см. табл. А.4.

** Рассчитывается как $\frac{N_{GPCR}}{S_{acr}}$. Для N_{GPCR} см. табл. А.4.

*** Рассчитывается как $(N_{CaRetSlow}) / (N_a \times V_{acr})$. Для $N_{CaRetSlow}$ см. табл. А.4.

**** Рассчитывается как $(N_{CaRetFast}) / (N_a \times V_{acr})$. Для $N_{CaRetFast}$ см. табл. А.4.

***** Рассчитывается как $(N_{CaMSlow}) / (N_a \times V_{cyt})$. Для $N_{CaMSlow}$ см. табл. А.4.

***** Рассчитывается как $(N_{CaMFast}) / (N_a \times V_{cyt})$. Для $N_{CaMFast}$ см. табл. А.4.

***** Рассчитывается как $\frac{N_{PLC\beta}}{S_{acr}}$. Для $N_{PLC\beta}$ см. табл. А.4.

Обозначения переменных модели указаны в Таблице П.4. Обозначения параметров модели указаны в Таблице П.5.

Таблица П.5. Средние по времени значения переменных при активации 50 мкМ прогестерона

Переменная	Среднее значение	Переменная	Среднее значение	Переменная	Среднее значение
$PLC\beta_{avg}$	15 /мкМ ²	$PGE2_{avg}$	0.15 мкМ	[CaRetSlow]	2500 мкМ
$PLC\beta_{ACT_{avg}}$	6 /мкМ ²	$ABHD2_{avg}$	8 /мкМ ²	[CaMFast]	10 мкМ
$\beta\gamma_{avg}$	33 /мкМ ²	$ABHD2^*_{avg}$	6 /мкМ ²	[CaMSlow]	6 мкМ
$G\alpha^{GTP}_{avg}$	200 /мкМ ²	$IP3_{avg}$	0.1 мкМ	[CaRetFastCa]	300 мкМ
$GPCR_{act}_{avg}$	13 /мкМ ²	$Ca_{Cyt}^{2+}_{avg}$	0.25 мкМ	[CaRetSlowCa]	300 мкМ
$GPCR_{avg}$	5 /мкМ ²	$Ca_{Acr}^{2+}_{avg}$	10 мкМ	[CaMFastCa]	4.5 мкМ
AG_{avg}	0,6 мкМ	[CaRetFast]	10 мкМ	[CaMSlowCa]	0.8 мкМ

Таблица П.6. Параметры модели

	Значение	Ссылка	Комментарий
Кальциевый модуль			
K1	0,13 мкМ	[П2]	Параметр IP ₃ R
K2	30 мкМ	[П8]	Параметр IP ₃ R
K3	0,003 мкМ	[П8]	Параметр IP ₃ R
K5	0,13 мкМ	[П8]	Параметр IP ₃ R
a_2	10 ⁻⁴	[П8]	Параметр IP ₃ R

	Значение	Ссылка	Комментарий
V_{SPCA}	2,31 мкМ/с	Подбор	Максимальная скорость SPCA
K_{SPCA}	0,27 мкМ	[П10]	Аффинность SPCA к кальцию
k_{leak}	0,01	Подбор	Коэффициент утечки из акросомы
k_{IP3}	$0,00007 (\text{мкМ} \times \text{с})^{-1}$	[П11]	Поток через 1 открытый IP_3R
k_{leakPP}	0,15 мкМ/с	[П10]	Утечка кальция в цитозоль
K_{PLC}	0,7 мкМ	[П12]	Аффинность к кальцию PLC_{δ}
k_{PLC}	5000 с^{-1}	[П25]	Каталитическая константа PLC_{δ} и PLC_{β}
$N_{PLC\delta}$	15	Метод оценки описан в [П24] на основе [П6]	Количество PLC_{δ}
$N_{PLC\beta}$	140	Метод оценки описан в [П24] на основе [П6]	Количество PLC_{β}
N_{IP3}	1850	Метод оценки описан в [П24] на основе [П6]	Количество IP_3R
N_{IP5pp}	240	Метод оценки описан в [П24] на основе [П6]	Количество $IP5pp$
$k_{catIP5pp}$	340 с^{-1}	[П26]	Каталитическая константа $IP5pp$
K_{IP5pp}	0,7 мкМ	[П14]	Аффинность $IP5PP$ к IP_3
N_{CaRet}	54000	Метод оценки описан в [П24] на основе [П6]	Количество CaRet
$N_{CaRetSlow}$	$N_{CaRetSlow} \times 18$	[П15]	Емкость сайта С кальретикулина
$N_{CaRetFast}$	$N_{CaRetSlow} \times 2$	[П15]	Емкость сайта Р кальретикулина
$k_{+CaRetSlow}$	$0,1 (\text{мкМ} \times \text{с})^{-1}$	[П16]	Скорость ассоциации сайта С с кальцием
$K_{dCaRetSlow}$	2000 мкМ	[П16]	Константа диссоциации сайта С и кальция

	Значение	Ссылка	Комментарий
$k_{+CaRetFast}$	0,05	[П15]	Скорость ассоциации сайта Р с кальцием
$K_{dCaRetFast}$	1 мкМ	[П17]	Константа диссоциации сайта Р и кальция
N_{CaM}	54000	Метод оценки описан в [П24] на основе [П6]	Количество молекул кальмодулина
$N_{CaMSlow}$	$N_{CaM} \times 2$	[П16]	Емкость сайта N кальмодулина
$N_{CaMFast}$	$N_{CaM} \times 2$	[П16]	Емкость сайта С кальмодулина
$k_{+CaMSlow}$	10 c^{-1}	[П18]	Скорость ассоциации сайта С кальмодулина с кальцием
$K_{dCaMSlow}$	1 мкМ	[П16]	Константа диссоциации сайта С кальмодулина и кальция
$k_{+CaMFast}$	$100 (\text{мкМ} \times \text{c})^{-1}$	[П18]	Скорость ассоциации сайта N кальмодулина с кальцием
$k_{-CaMFast}$	500 c^{-1}	[П18]	Скорость диссоциации сайта N кальмодулина с кальцием
V_{PMCA}	1 мкМ	[П19]	Максимальная скорость PMCA
K_{PMCA}	0,27 мкМ	[П27]	Константа полуактивации PMCA
Модуль ABHD2-PLC β			
$k_{catABHD}$	0,35	[П28]	Каталитическая константа для ABHD2
$K_{mABHD-AG}$	12 мкМ	[П15]	Аффинность ABHD2 к 2-AG
$k_{+ABHDProg}$	3	[П15]	k_{+} для связывания прогестерона и ABHD2
$K_{mABHDProg}$	16	[6]	Аффинность ABHD2 к прогестерону

	Значение	Ссылка	Комментарий
k_{AA}	0,01	[П6]	Скорость генерации 2-AG мембраной
N_{gpcr}	400	Метод оценки описан в [П24] на основе [П6]	Начальное количество молекул ABHD2
k_{diss}	25 c^{-1}	[П29]	Параметр активации GPCR
k_{G1}	10^{-6} c^{-1}	[П29]	Параметр активации GPCR
M	0,5 мкМ	[П29]	Полная концентрация GPCR
K_{G2}	0,5 мкМ	[П29]	Параметр активации GPCR
K_{G3}	0,002 мкМ	[П29]	Параметр активации GPCR
[GAP]	0,025 мкМ	[П29]	Концентрация GAP в клетке
k_{hydr}	5	[П29]	Параметр активации GPCR
$k_{DActPLC}$	1 c^{-1}	Подбор	Скорость деактивации PLC β
k_a	$5 (\text{мкМ} \times \text{c})^{-1}$	Подбор	Скорость активации PLC β α^{GTP} -субъединицей
k_{intern}	$0,01 \text{ c}^{-1}$	[П29]	Скорость интернализации активированного G-белка
$2AG_{Vol0}$	0,7 мкМ	[П7]	Начальная объемная концентрация 2-AG
k_{COX}	$5,9 (\text{мкМ} \times \text{c})^{-1}$	[П30]	Скорость конвертации AA в PGE2 циклооксигеназой
N_{COX}	400	[П6]	Количество циклооксигеназы в сперматозоиде
k_{degPGE}	$0,006 \text{ c}^{-1}$	[П31]	Скорость деградации PGE2

	Значение	Ссылка	Комментарий
k_{GPCR}	1 с ⁻¹	Подбор	Скорость диссоциации PGE2 и GPCR
K_{dGPCR}	0,001 мкМ	[П32]	Константа диссоциации комплекса PGE2-GPCR

Литература

- П1. Correia, J. Regulation and roles of Ca²⁺ stores in human sperm / J. Correia, F. Michelangeli, S. Publicover // REPRODUCTION. – 2015. – Т. 150. – № 2. – С. R65-R76.
- П2. Young, G. W. De. A single-pool inositol 1,4,5-trisphosphate-receptor-based model for agonist-stimulated oscillations in Ca²⁺ concentration. / G. W. De Young, J. Keizer // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1992. – Т. 89. – № 20. – С. 9895-9899.
- П3. Li, Y.-X. Equations for InsP₃ Receptor-mediated [Ca²⁺]_i Oscillations Derived from a Detailed Kinetic Model: A Hodgkin-Huxley Like Formalism / Y.-X. Li, J. Rinzel // Journal of Theoretical Biology. – 1994. – Vol. 166. – Equations for InsP₃ Receptor-mediated [Ca²⁺]_i Oscillations Derived from a Detailed Kinetic Model. – № 4. – P. 461-473.
- П4. Molecular characterization of human ABHD2 as TAG lipase and ester hydrolase / N. K. M., T. V.B.S.C., V. G.K. [и др.] // Bioscience Reports. – 2016. – Т. 36. – № 4.
- П5. Specific Inter-residue Interactions as Determinants of Human Monoacylglycerol Lipase Catalytic Competency / S. Tyukhtenko, I. Karageorgos, G. Rajarshi [и др.] // Journal of Biological Chemistry. – 2016. – Т. 291. – № 6. – С. 2556-2565.
- П6. PaxDb, a Database of Protein Abundance Averages Across All Three Domains of Life / M. Wang, M. Weiss, M. Simonovic [и др.] // Molecular & Cellular Proteomics. – 2012. – Т. 11. – № 8. – С. 492-500.
- П7. Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone / M. R. Miller, N. Mannowetz, A. T. Iavarone [и др.] // Science. – 2016. – Т. 352. – № 6285. – С. 555-559.
- П8. Comparison of gating dynamics of different IP₃ R channels with immune algorithm searching for channel parameter distributions / X. Cai, X. Li, H. Qi [и др.] // Physical Biology. – 2016. – Т. 13. – № 5. – С. 056005.

- П9. Carafoli, E. Intracellular Calcium Homeostasis / E. Carafoli // Annual Review of Biochemistry. – 1987. – Т. 56. – № 1. – С. 395-433.
- П10. Modeling of progesterone-induced intracellular calcium signaling in human spermatozoa / L.-F. Li, C. Xiang, Y.-B. Zhu, K.-R. Qin // Journal of Theoretical Biology. – 2014. – Т. 351. – С. 58-66.
- П11. Vais, H. Unitary Ca²⁺ current through recombinant type 3 InsP₃ receptor channels under physiological ionic conditions / H. Vais, J. K. Foskett, D.-O. Daniel Mak // The Journal of General Physiology. – 2010. – Т. 136. – № 6. – С. 687-700.
- П12. Olson, S. D. A Model of CatSper Channel Mediated Calcium Dynamics in Mammalian Spermatozoa / S. D. Olson, S. S. Suarez, L. J. Fauci // Bulletin of Mathematical Biology. – 2010. – Т. 72. – № 8. – С. 1925-1946.
- П13. Banno, Y. Characterization of partially purified phospholipase C from human platelet membranes / Y. Banno, Y. Nozawa // Biochemical Journal. – 1987. – Т. 248. – № 1. – С. 95-101.
- П14. Sims, C. E. Metabolism of Inositol 1,4,5-Trisphosphate and Inositol 1,3,4,5-Tetrakisphosphate by the Oocytes of *Xenopus laevis* / C. E. Sims, N. L. Allbritton // Journal of Biological Chemistry. – 1998. – Т. 273. – № 7. – С. 4052-4058.
- П15. Baksh, S. Expression of calreticulin in *Escherichia coli* and identification of its Ca²⁺ binding domains. / S. Baksh, M. Michalak // The Journal of biological chemistry. – 1991. – Т. 266. – № 32. – С. 21458-65.
- П16. Reaction Diffusion Modeling of Calcium Dynamics with Realistic ER Geometry / S. Means, A. J. Smith, J. Shepherd [и др.] // Biophysical Journal. – 2006. – Т. 91. – № 2. – С. 537-557.
- П17. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. / M. Michalak, E. F. Corbett, N. Mesaeli [и др.] // The Biochemical journal. – 1999. – Т. 344 Pt 2. – С. 281-92.
- П18. Neurogranin Alters the Structure and Calcium Binding Properties of Calmodulin / L. Hoffman, A. Chandrasekar, X. Wang [и др.] // Journal of Biological Chemistry. – 2014. – Т. 289. – № 21. – С. 14644-14655.
- П19. Wennemuth, G. Calcium Clearance Mechanisms of Mouse Sperm / G. Wennemuth, D. F. Babcock, B. Hille // The Journal of General Physiology. – 2003. – Т. 122. – № 1. – С. 115-128.
- П20. Direct Imaging of ER Calcium with Targeted-Esterase Induced Dye Loading (TED) / S. Samtleben, J. Jaepel, C. Fecher [и др.] // Journal of Visualized Experiments. – 2013. – № 75.

- П21. Hindered cytoplasmic diffusion of inositol trisphosphate restricts its cellular range of action / G. D. Dickinson, K. L. Ellefsen, S. P. Dawson [и др.] // *Science Signaling*. – 2016. – Т. 9. – № 453. – С. ra108-ra108.
- П22. The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store / S. B. Herrick, D. L. Schweissinger, S. Kim [et al.] // *Journal of Cellular Physiology*. – 2005. – Vol. 202. – № 3. – P. 663-671.
- П23. Sperm Volume Regulation: Maturational Changes in Fertile and Infertile Transgenic Mice and Association with Kinematics and Tail Angulation1 / C.-H. Yeung, M. Anapolski, P. Sipilä [et al.] // *Biology of Reproduction*. – 2002. – Vol. 67. – Sperm Volume Regulation. – № 1. – P. 269-275.
- П24. Occurrence of Calcium Oscillations in Human Spermatozoa Is Based on Spatial Signaling Enzymes Distribution / J. Korobkin, F. A. Balabin, S. A. Yakovenko [и др.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Т. 22. – № 15. – С. 8018.
- П25. Kadamur, G. Mammalian Phospholipase C / G. Kadamur, E. M. Ross // *Annual Review of Physiology*. – 2013. – Vol. 75. – № 1. – P. 127-154.
- П26. Glutamate regulation of calcium and IP₃ oscillating and pulsating dynamics in astrocytes / M. De Pittà, M. Goldberg, V. Volman [et al.] // *Journal of Biological Physics*. – 2009. – Vol. 35. – № 4. – P. 383-411.
- П27. Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps / J. Lytton, M. Westlin, S. E. Burk [и др.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1992. – Т. 267. – № 20. – С. 14483-14489.
- П28. Hydrolysis of Prostaglandin Glycerol Esters by the Endocannabinoid-Hydrolyzing Enzymes, Monoacylglycerol Lipase and Fatty Acid Amide Hydrolase / A. Vila, A. Rosengarth, D. Piomelli [et al.] // *Biochemistry*. – 2007. – Vol. 46. – № 33. – P. 9578-9585.
- П29. Katanaev, V. L. Kinetic diversity in G-protein-coupled receptor signalling / V. L. Katanaev, M. Chornomorets // *Biochemical Journal*. – 2007. – Vol. 401. – № 2. – P. 485-495.
- П30. Liu, Y. A Revised Mechanism for Human Cyclooxygenase-2 / Y. Liu, J. P. Roth // *Journal of Biological Chemistry*. – 2016. – Vol. 291. – № 2. – P. 948-958.
- П31. Hwa, J. The Eicosanoids: Prostaglandins, Thromboxanes, Leukotrienes, & Related Compounds / J. Hwa, K. Martin. – Текст : электронный // *Basic & Clinical Pharmacology*, 14e : в Book, Section т. / ред. B. G. Katzung. – New

York, NY : McGraw-Hill Education, 2017. – URL:
accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1148435429 (дата обращения:
19.03.2025).

П32. Characterization of [³H]-prostaglandin E₂ binding to prostaglandin EP₄ receptors expressed with Semliki Forest virus / F. H. Marshall, K. Patel, K. Lundstrom [et al.] // British Journal of Pharmacology. – 1997. – Vol. 121. – № 8. – P. 1673-1678.